AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SUBUNIDADES
ALFA E BETA DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE DE PIRARUCU
(*Arapaima gigas*)**

Thais Cristina dos Anjos Sevilhano

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações.**

**Orientador:
Prof. Dr. Paolo Bartolini**

**São Paulo
2015**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SUBUNIDADES
ALFA E BETA DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE DE PIRARUCU**
(*Arapaima gigas*)

Thais Cristina dos Anjos Sevilhano

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-
Aplicações**

Orientador:
Prof. Dr. Paolo Bartolini

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Helaine e Walter Sérgio Sevilhano** por todo amor, compreensão e respeito com que fui criada, por todas as noites perdidas, por serem meus exemplos de seres humanos, por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditava. Sem vocês, nada disso faria sentido.

Aos meus avós, **Anair e Waltermiro dos Anjos, Neuza e Walter Sevilhano** por iluminarem meu caminho e guiar meus passos diariamente. Tenho certeza de que vocês sempre estarão olhando por mim.

Ao meu orientador e “pai” científico, **Prof. Dr. Paolo Bartolini** pela confiança depositada, pelo incentivo diário e por todo aprendizado. Obrigada por me fazer entender que com garra e determinação podemos chegar mais longe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida

Ao meu irmão, Felipe Sevilhano por ser meu eterno vínculo com o passado e minha única certeza no futuro. Por você, eu dou a minha vida.

À Prof. Eliana Perroud por me incentivar a iniciar a vida científica e ser meu maior exemplo durante a graduação.

À Dra. Riviane Garcez pela paciência e contribuição nos estudos filogenéticos.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares por ter acreditado na minha capacidade e possibilitado meu ingresso no IPEN.

À Prof. Dra Cibele Nunes Peroni por toda experiência compartilhada.

À Prof. Maria Teresa Carvalho Pinto Ribela por todo incentivo.

À Prof. Regina Affonso por toda paciência e dicas dadas durante esse trabalho.

Ao Dr. João Ezequiel por ser tão solícito todas as vezes que precisei.

À Dra Miriam Suzuki por sanar meus problemas científicos sempre com bom humor e boa vontade.

Ao Dr. Nélcio de Oliveira por guiar meus primeiros passos durante o mestrado.

Ao “irmão científico” Roberto Feitosa de Carvalho por todos os anos de amizade e parceria, por toda a ajuda e principalmente por não me deixar desistir.

À amiga Eliana Lima por fazer meus dias mais leves, por toda parceria e companheirismo, fundamental para que eu concluísse esse trabalho com sanidade mental.

À amiga Renata Damiani por todas as manhãs de desabafo, pela alegria, sarcasmo e piadas incríveis.

À amiga Eliza Higuti por todas as gargalhadas matinais e principalmente por todas as vezes que me fez engordar.

Às amigas Cláudia Cecchi e Flávia Valgode, por todo incentivo e por ter me apresentado para o grupo de hormônios, possibilitando meu ingresso na pós-graduação.

À amiga Fernanda Arthuso por toda amizade, protocolos e tempo gasto com esse trabalho.

À amiga Patrícia Marinho pelas angustias compartilhadas, pelas risadas e pelas horas de análise gratuita.

Aos amigos da vida, Thiciani Tiezzi, Thais Ludmilla, Natália Moro, Gabrielle Sato, Vicky Forshaid, Paula Igrejas, Lucilia Baracho, Leandro Gotti, Leandro Mormillo, Gustavo Jesus, Luana Baracho, Letícia Gonçalves, Romina Dayne, Gabriela Macedo, Ronniery Bandeira, Aranã Cunha, Priscila Botelho por terem me escolhido como amiga e feito minha vida mais feliz.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia de Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- Arlete, Dra Beatriz, Caroline, Dr. Perez, Hugo, Ivette, José Maria, Junqueira, Dra. Kayo, Karina, Laura, Mayara, Dra Marina, Dra Nanci, Neia, Gislaine, Sandra, Elizangela, Dr. Nélio, Neide, Dra Olga, Dr. Patrick, Rute, Dr. Natália, Rosangela, Dr. Vicent, Tamara, Victor pela compreensão e colaboração

À todos os funcionários do Centro de Biotecnologia que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao IPEN, FAPESP, CNPq, CAPES pelo apoio financeiro e técnico.

“Morre lentamente quem não viaja, quem não lê quem não ouve música, quem não encontra graça em si mesmo. Morre lentamente quem se torna escravo do hábito, repetindo todos os dias os mesmos trajetos, quem não muda de marca, não arrisca vestir uma nova cor, quem não conversa com quem não conhece. Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com seu trabalho ou amor, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não permite, pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos. “

(Pablo Neruda)

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SUBUNIDADES
ALFA E BETA DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE DE PIRARUCU
(*Arapaima gigas*)**

Thais Cristina dos Anjos Sevilhano

RESUMO

O “*Arapaima gigas*”, conhecido popularmente como pirarucu é uma espécie de peixe pertencente à ordem dos Osteoglossiformes, nativo da Bacia Amazônica e autóctone da Bacia de São Francisco e do Nordeste. É considerado um dos maiores peixes de água doce do mundo, chegando, na fase adulta, a três metros de comprimento e mais de 200 kg de peso, possuindo, portanto, uma grande importância para a alimentação e o comércio da região. Infelizmente esta espécie pertence à lista de animais sobre explorados do IBAMA, também em perigo de extinção, devido especialmente à pesca predatória e à sua dificuldade reprodutiva em cativeiro. Por estas razões, desenvolvemos o presente trabalho de clonagem e caracterização de um de seus hormônios da reprodução (gonadotrofinas), em particular o hormônio luteinizante (LH). Esta glicoproteína é constituída por duas subunidades ligadas de forma não covalente: a subunidade α (GTH α) comum também ao hormônio folículo estimulante (FSH) e a subunidade β , que confere a especificidade de sua ação biológica. Tanto o cDNA do ag-GTH α quanto aquele do ag-LH β foram sintetizados pela reação de transcriptase reversa (RT) e pela reação de cadeia de polimerase (PCR) utilizando vários “primers”, a partir do RNA total obtido das glândulas hipofisárias de *A.gigas*. O cDNA de GTH α apresentou um comprimento total de 767 pb incluindo uma cadeia poli-A de 20 adeninas. Foi identificada uma região codificante (ORF) de 348 pb iniciando com o primeiro códon (ATG) na posição 58 e o códon de parada (“stop”) na posição 403. O sinal de poliadenilação (ATTAAA) foi localizado 18 pb antes da cauda poli-A. A região codificante traduz um peptídeo de 115 aminoácidos, com um sítio de clivagem do peptídeo sinalizador situado entre o aminoácido 24 e 25. A proteína apresenta portanto um suposto peptídeo sinal de 24 aminoácidos e um peptídeo maduro de

91 aminoácidos, que quando alinhado com outras espécies de peixes, mostra a conservação de 10 resíduos de cisteína, 3 prolínas e dois potenciais sítios de glicosilação entre os aminoácidos 51-53 (NIT) e os aminoácidos 77-79 (NHT). O cDNA de ag-LH β apresenta um comprimento total de 711 pb, incluindo uma cadeia poli-A de 18 adeninas. Foi identificada uma região codificante (ORF) de 426 pb, iniciando com primeiro códon (ATG) na posição 47 e terminando na posição 469. O sinal de poliadenilação (AATAAA) foi localizado 18 pb antes da cadeia poli-A. A região codificante traduz um peptídeo sinalizador situado entre o aminoácido 24 e 25. Com isso, temos um peptídeo sinalizador de 24 e um peptídeo maduro de 117 aminoácidos que apresenta a conservação de 12 resíduos de cisteína, 6 prolínas e um sítio potencial de N-glicosilação identificado entre os aminoácidos 10-12 (NQT), enquanto um segundo possível sítio de N-glicosilação (alterado para QTT), entre os aminoácidos 27-29, foi perdido. Como na subunidade GTH α , a maior porcentagem de identidade de LH β foi com os Cypriniformes (75.6%) enquanto a menor foi com os Gadiformes (53.8%). A análise filogenética realizada utilizando as sequências de FSH β e LH β de 41 espécies de peixes, incluindo o *A.gigas*, confirmou os dados publicados relativos à subunidade GTH α , posicionando o *A.gigas* como grupo irmão dos Clupeocephala e os Elopomorpha (Anguilliformes) como grupo mais basal entre os teleósteos .

CLONING, CHARACTERIZATION AND PHYLOGENTIC ANALYSIS OF THE ALPHA AND BETA SUBUNITS OF LUTEINIZING HORMONE OF PIRARUCU (*ARAPAIMA GIGAS*)

ABSTRACT

Arapaima gigas, popularly known as pirarucu, is a species of fish that belongs to the order of Osteoglossiformes, originating from the Amazon, São Francisco river basin and the North East of Brazil. It is considered one of the largest fresh water fishes in the world, reaching when adult three meters in length and more than 200 kg in weight. It is therefore very important for food and for the regional industry. Unfortunately, this species belongs to the list of overexploited animals from IBAMA and is in danger of disappearing due to fishing exploitation and to its reproductive difficulties, especially in captivity. For these reasons, we developed this project for the cloning and characterization of one of its hormones of reproduction (gonadotropins), namely luteinizing hormone (LH). This glycoprotein is formed by two subunits non-covalently bound: the α subunit (GTH α), in common with follicle-stimulating hormone (FSH) and the β subunit, that provides the specificity of its biological action. Both cDNAs of ag-GTH α and of ag-LH β have been synthesized via reverse transcriptase (RT) and polymerase chain reaction (PCR) utilizing several primers, starting from total RNA extracted from *A. gigas* pituitary glands. The cDNA of ag-GTH α showed a total length of 767 bp, including a poly-A tail with 20 adenines. A coding region (ORF) of 348 bp, was also identified, starting from the first codon (ATG) at position 58, with the stop codon at position 403. The polyadenylation signal (ATTAAA) was identified 18 bp before the poly-A tail. This coding sequence translates a 115 amino acid peptide showing a signal-peptide cleavage site between amino acid 24 and 25. It has therefore a putative signal peptide with 24 and a mature peptide with 91 amino acids that, when aligned with other species of fish, presents 10 conserved residues of cysteine, 3 of proline and two potential glycosylation sites at amino acids 51-53 (NIT) and amino acids 77-79 (NHT). The cDNA of ag-LH β has instead a total length of 711 bp, including a poly-A tail of 18 adenines. A coding region of 426 bp

was identified, starting with the first codon (ATG) at position 47 and having the stop codon at position 469. The polyadenylation signal (AATAAA) was found 18 bp before the poly-A tail. The coding region translates a signal-peptide located between amino acid 24 and 25. It has a signal peptide with 24 and a mature peptide with 117 amino acids that presents 12 conserved residues of cysteine, 6 of proline and a potential N-glycosylation site at amino acid 10-12 (NQT), while a second possible N-glycosylation site at amino acid 27-29 (altered into QTT), was lost due to the substitution of an asparagine with a glutamine. As for the case of ag-GTH α , the highest percent of identity was found with Cypriniformes (75.6%), while the lowest was with Gadiformes (53.8%). The phylogenetic analysis carried out with cDNA sequences of LH β and FSH β of 41 different fish species, confirmed previous published data concerning ag-GTH α , locating *A.gigas* as the sister group of Clupeocephala and the Elopomorpha (Anguilliformes) as the most basal group of all living teleosts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	MATERIAL	21
3.1.1	Extração de RNA total	21
3.1.2	Isolamento das subunidades α e β de ag-LH	21
3.1.3	Análise de ácidos nucleicos	21
3.1.4	Construção de vetores dicistrônicos	22
3.1.4.1	Vetores	22
3.1.4.2	Reagentes químicos	22
3.1.4.3	Material plástico estéril	22
3.1.4.4	Equipamentos e acessórios principais	23
3.2	MÉTODOS	24
3.2.1	Coleta das hipófises	24
3.2.2	Obtenção dos genes das subunidades α e β do ag-LH	25
3.2.2.1	Extração de RNA total	25
3.2.2.2	Construção de iniciadores ("primers") específicos e não específicos	25
3.2.3	Transcrição Reversa pela Reação em Cadeia de Polimerase (RT- PCR)	29
3.2.4	Reação em cadeia de Polimerase (PCR) para obtenção de uma primeira sequência específica parcial	29
3.2.5	Rápida Amplificação das Extremidades Finais (RACE) do cDNA para GTH α ...	30
3.2.6	Rápida amplificação das extremidades finais do cDNA (RACE) para LH β	33
3.2.7	Confirmação da sequência total de ag-GTH α e ag-LH β	33
3.2.8	Análise em gel de agarose	34
3.2.9	Purificação enzimática do produto pós-PCR	34
3.2.10	Quantificação dos ácidos nucleicos	34
3.2.11	Sequenciamento das amostras de cDNA obtidas	35
3.2.12	Análise Filogenética	36
3.2.13	Inserção do cDNA da cadeia α em vetor de expressão dicistrônico	38
3.2.13.1	Obtenção da região codificadora de GTH α	38
3.2.13.2	Clivagem do vetor de expressão aberto e do inserto que codifica o GTH α com enzimas de restrição	38

3.2.13.3	Ligação do inserto no vetor de expressão	39
3.2.13.4	Transformação pelo método de choque térmico.....	39
3.2.13.5	Seleção de colônias para detecção de clones positivos	39
3.2.13.6	Midi preparação de DNA plasmidial	40
4	RESULTADOS	40
4.1	Extração de RNA total.....	40
4.2	Obtenção do cDNA de GTH α de <i>Arapaima gigas</i>	41
4.2.1	Obtenção de uma primeira sequência parcial de ag-GTH α	41
4.2.2	Utilização do sistema RACE para obter a sequência completa do ag-GTH α	42
4.2.3	Confirmação do cDNA de ag-GTH α	43
4.2.4	Alinhamento e porcentagem de identidade entre os GTH α de várias ordens	44
4.2.5	Árvore filogenética com dados da sequência de aminoácidos de GTH α	47
4.3	Obtenção do cDNA da subunidade β do hormônio luteinizante (LH β) de <i>Arapaima gigas</i>	48
4.3.1	Obtenção de uma primeira sequência parcial para LH β	49
4.3.2	Utilização do sistema RACE para obter a sequência completa de ag-LH β	50
4.3.3	Confirmação do cDNA de ag-LH β	52
4.3.4	Alinhamento e porcentagem de identidade entre os LH β de várias ordens	54
4.3.5	Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de aminoácidos e de nucleotídeos de LH β	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	66
7	REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ag – *Arapaima gigas*

AAP – *Abridged Anchor Primer*

AUAP – *Abridged Universal Amplification Primer*

AP – *Adapter primer*

CEGH – Centro de Estudos do Genoma Humano

CHO – Células de ovário de *hamster* chinês

CITES – *Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna*

E. coli – *Escherichia coli*

FSH – Hormônio folículo estimulante

GTH – Hormônio gonadotrófico

GSP – *Gene Specific Primer*

LB – Luria-Bertani

LH – Hormônio luteinizante

ORF – *Open Reading Frame*

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RT – Transcriptase reversa

RACE – Amplificação rápida das extremidades finais de cDNA

Taq – *Thermus aquaticus*

TSH – Hormônio estimulador da tireóide

UV – Luz ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

O *Arapaima gigas*, popularmente conhecido como pirarucu no Brasil e paiche no Peru, é um peixe do período jurássico, sendo considerado o mais antigo entre os teleósteos vivos. Apresenta características filogenéticas e morfológicas únicas, que o classifica como “um fóssil vivo”, de fundamental importância para estudos comparativos sobre a evolução dos teleósteos (Saint *et al.* 1986)

Esta espécie pertencente à superordem Osteoglossomorpha, ordem Osteoglossiformes, família Arapaimidae e subfamília Heterotidinae é nativa da Bacia Amazônica e autóctone da Bacia do São Francisco e do Nordeste.

O nome "pirarucu" é derivado de dois termos indígenas, pira "peixe" e urucum "vermelho" devido à coloração avermelhada de sua cauda. É considerado um dos maiores peixes de água doce do mundo por apresentar rápido crescimento, atingindo até dez quilos no primeiro ano de criação, chegando, na fase adulta, a três metros de comprimento e mais de 200 kg de peso (Imbiriba, 2001). Um exemplar dessa espécie pode ser observado na Figura 1.

A maturação sexual ocorre do terceiro ao quinto ano de vida, com 1,60 a 1,70 metros de comprimento e cerca de 40 a 50 kg de peso, sendo que os ovos são depositados em ninhos e os machos ficam responsáveis pelos cuidados com a prole. Neste período apresentam dimorfismo sexual, onde o macho adquire coloração avermelhada mais intensa (Ono *et al.* 2004).

FIGURA 1. *Arapaima gigas* (pirarucu), vivendo nos rios da Amazônia. Fonte: <http://chc.cienciahoje.uol.com.br/o-gigante-da-amazonia/>. Acesso em 23 de fevereiro de 2015.

Apresenta hábitos carnívoros, alimentando-se de pequenos peixes, particularmente da família Loricaridae (os cascudos e os tamuatás) e ainda possui a habilidade da respiração aérea, suportando eventuais condições de baixo oxigênio dissolvido na água ou até a ausência do mesmo sem maiores prejuízos ao seu desempenho e sobrevivência. Além disso, realiza desova parcelada e apresenta baixa fecundidade, que é compensada pelos cuidados à prole, evitando a predação da ninhada por outros peixes (Ono *et al.* 2004)

Sua carne de coloração naturalmente rósea e desprovida de espinhas é bastante valorizada na região amazônica e desfruta de preços atrativos nos mercados externos. A comercialização da carne do pirarucu ocorre principalmente na forma de mantas salgadas, daí a denominação de “bacalhau brasileiro”. Além da carne, aproveitam-se ainda as escamas (FIG.2), a língua óssea, os ovos e a pele, contribuindo para o incremento econômico do cultivo dessa espécie (WWF-BR-2011).

FIGURA 2. Duas escamas de pirarucu sobrepostas da forma como se apresentam no peixe. Fonte: <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/escamas-pirarucu>. Acesso em 23 de fevereiro de 2015.

Até 1970, o pirarucu foi a espécie mais importante para o comércio de pescado na região, porém, devido à pesca predatória, os estoques naturais sofreram grande redução nas últimas décadas. Tal fato permitiu que esta espécie entrasse para a lista de animais sobre explorados do IBAMA ou em perigo de extinção de acordo com a “Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Como consequência da exploração dos estoques naturais, o *A. gigas* tornou-se uma das poucas espécies de peixe listadas no Anexo II da “*Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção*”. Em 1991, foi determinado que o “período defeso” desta espécie fosse de outubro a março nos rios Araguaia e Tocantins. Em 2001 o governo brasileiro proibiu a pesca e comercialização de *A. gigas* provenientes de seu ambiente natural, exceto na reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, localizada na cidade de Tefé na Amazônia, o que não impediu a pesca ilegal e a sua venda em mercados e restaurantes (Farias et al., 2003).

As características desse peixe seriam suficientes para firmar sua posição entre as principais espécies da aquicultura industrial no Brasil, porém isso ainda não ocorreu por não ter se estabelecido no Brasil qualquer empreendimento capaz de produzir alevinos de forma previsível, a preços competitivos e em

quantidade capaz de dar suporte ao cultivo em larga escala. Além disso, de um modo geral, os peixes criados em cativeiro apresentam dificuldades na ovulação e espermição, podendo apresentar também ausência da maturação final dos ovócitos (Fontaine, 1975).

Todas as falências reprodutivas mencionadas são ligadas a fatores hormonais do eixo hipotálamo-hipófise. Os hormônios glicoprotéicos da hipófise dos vertebrados são as gonadotrofinas (GTHs) e a tireotrofina (TSH), as GTH compreendendo o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio estimulador de folículos (FSH). Os três glicohormônios hipofisários são compostos por duas subunidades, chamadas de subunidade α e β , ligadas de forma não covalente (Degani *et al*, 2003). A subunidade α apresenta-se comum para os três hormônios glicoproteicos, enquanto a subunidade β é espécie-específica e determina cada atividade hormonal (Schmitz *et al*, 2005).

O processo reprodutivo dos peixes se inicia a partir do momento em que atingem a idade e o peso mínimo. Alterações ambientais como o fotoperíodo, a temperatura e, possivelmente, as chuvas, são captadas através dos olhos, glândula pineal, narinas e receptores cutâneos, que as convertem em sinais eletroquímicos e são transmitidos via neurônios sensoriais até o hipotálamo (Filho 2007).

Diversos mecanismos estão envolvidos no processo de maturação gonadal e desova em peixes. No início do desenvolvimento gonadal, ocorre um aumento no nível dos GTHs na hipófise e no plasma, servindo provavelmente para recrutar os ovócitos e iniciar a vitelogênese. Essa elevação do nível dos GTH estimula o aumento de testosterona e estrogênio; esses níveis, porém, diminuem rapidamente. No final da vitelogênese, o nível dos GTH volta a crescer na hipófise e no plasma, assim como a testosterona e o estrogênio. Em algumas espécies de peixes, porém, não existe um padrão de variação da concentração dos hormônios gonadotróficos no plasma relacionado ao estágio de desenvolvimento gonadal (Filho 2007).

Depois de concluída a vitelogênese, inicia-se o "*período de dormência*" onde a atividade ovariana se torna mais reduzida e permanece em sintonia com a adequação das condições ambientais, garantindo assim, que a liberação dos ovócitos coincida com o período em que as características ambientais estejam

mais adequadas, para propiciar a máxima sobrevivência da prole. Quando as condições ambientais são adequadas, ocorre a maturação dos ovócitos, onde a vesícula germinal (núcleo) migra para a periferia celular e se desintegra, liberando os ovócitos na luz do ovário. Essa fase é conhecida como ovulação (Filho 2007).

Um trabalho de revisão relativo aos circuitos neuroendócrinos que controlam estes hormônios e à reprodução dos teleósteos foi realizado por Zohar e colaboradores (2010). As interações com os receptores e o estudo da relação estrutura-função foram descritas por Swanson e colaboradores (2003), enquanto que aspectos filogenéticos relativos ao eixo hipotálamo–hipófise–gônadas foram tratados por Sower e colaboradores (2009).

Após o trabalho pioneiro de Suzuki et al. (1998) que apresentou a purificação e caracterização de duas gonadotrofinas distintas de *chum salmon*, comprovando a existência de duas gonadotrofinas em teleósteos, várias outras espécies de peixe tiveram suas gonadotrofinas clonadas e caracterizadas. A clonagem das subunidades α e β de FSH e LH foram realizadas em espécies como *Atlantic halibut* (Weltzen et al. 2003), goldfish (Kobayashi et al. 2005; Yoshiura et al. 1997), Russian sturgeon (Hurvitz et al. 2005), rockfish (Kim et al. 2005), Manchurian trout (Choi et al. 2005), zebrafish (So et al. 2005), Senegalese sole (Cerdà et al. 2008), marbled eel (Huang et al. 2009), Chinese sturgeon (Cao et al. 2009), Atlantic cod (Mittelholzer et al. 2009) e sablefish (Guzman et al. 2013). Entre esses trabalhos, Kim et al. (2005), Choi et al. (2005), So et al. (2005) e Huang et al. (2009) apresentaram também árvores filogenéticas das subunidades α e β de ambas gonadotrofinas. No que diz respeito à expressão de FSH e LH para goldfish a síntese foi obtida através de baculovirus (Kobayashi et al. 2003) enquanto para Japanese eel (Kamei et al. 2003), tilapia (Kasuto and Levavi-Sivan 2005; Aizen et al. 2007) e zebrafish (Yu et al. 2010) utilizou-se levedura, como a *Pichia pastoris*. A expressão em células CHO, estável ou transiente, de ambas gonadotrofinas foi obtida para Manchurian trout (Choi et al. 2005) e zebrafish (So et al. 2005). Com exceção de Kazeto et al. (2008) e Zmora et al. (2007) que utilizaram uma linhagem de células S2 drosophila para a síntese e purificação da Japanese eel e channel catfish, respectivamente, as gonadotrofinas recombinantes sintetizadas nunca apresentaram uma extensiva purificação e caracterização, na maioria dos trabalhos sendo analisadas

principalmente por SDS-PAGE e Western blotting e testadas em diferentes bioensaios. Além disso, nenhuma espécie citada até agora pertence à ordem dos Osteoglossiformes ou superordem dos Osteoglossomorpha, à qual pertence o *A. gigas*.

Para a clonagem dos genes, meta do presente trabalho, e futura expressão do LH, deve-se lembrar que por ser um hormônio heterodimérico, este deve ser expresso por um vetor e em hospedeiros que permitam sua glicosilação e que ao mesmo tempo não apresentem toxicidade às subunidades α e β (Narayan *et al.* 2000; Shein *et al.* 2003).

Vetores de expressão dicistrônicos, contendo o gene de interesse na região 5' e um gene marcador de seleção na região 3' do vetor, tem mostrado uma abordagem bem sucedida para obtenção de células que expressam altos níveis de um gene de interesse na região 5' do vetor (Kaufman *et al.* 1991). Peroni e colaboradores (2002) obtiveram, de fato, altos níveis de expressão em células CHO do hormônio humano estimulador da tireóide (hTSH) e de sua forma humanizada (Damiani *et al.* 2009).

A partir disso, considerando também o interesse em se obter os anticorpos específicos relativos às duas gonadotrofinas, o presente projeto irá clonar, sequenciar e caracterizar o cDNA das subunidades α e β de ag-LH, que ainda não foram identificadas em absoluto, o que permitirá, no futuro, a expressão, purificação, caracterização e aplicações do LH dessa espécie (ag-LH). Com isso, a possibilidade de investigação nas áreas de filogenia, endocrinologia e reprodução do *A. gigas* e outros teleósteos serão ampliados, tendo também como objetivo o incremento da fertilidade desta espécie, especialmente quando criada no cativeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi isolar, caracterizar e realizar estudos filogenéticos relativos às subunidades α e β do hormônio luteinizante de *Arapaima gigas*, visando sua síntese em células CHO.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção de animais (*A. gigas*) e remoção da glândula hipofisária;
- Extração de RNA total;
- Construção de *primers* “consenso”, degenerados e específicos
- Transcrição reversa pela técnica de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR);
- Amplificação rápida das extremidades finais de cDNA (RACE);
- Sequenciamento de DNA complementar (cDNA);
- Alinhamento e estudo da porcentagem de identidade dos aminoácidos entre espécies;
- Análise filogenética de ag-GTH α e ag-LH β ;
- Clonagem das subunidades α e β em vetores de expressão dicistrônicos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Extração de RNA total

- Sistema de extração RNA total *Purelink Micro-to-Midi total RNA mini purification kit*, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).
- Cápsula de evaporação, diâmetro 50 mm, capacidade 50 mL Prolab (São Paulo, Brasil).
- Bastão de vidro, dimensões 5 mm X 300 mm, Prolab (São Paulo, Brasil).
- Nitrogênio líquido, White Martins (São Paulo, Brasil).
- 2-Mercaptoetanol, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Dietilpirocarbonato, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- *RNA Later*[®], Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

3.1.2 Isolamento das subunidades α e β de ag-LH

- Sistema *SuperScript*[®] III Reverse Transcriptase, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).
- *GoScript*[®] Reverse Transcription System, Promega (Madison, WIS, EUA).
- *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends*, Versão 2.0, Invitrogen[®] (Carlsbad, CA, EUA).
- *3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends*, Invitrogen[®] (Carlsbad, CA, EUA).
- Oligonucleotídeos em geral, sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA).

3.1.3 Análise de ácidos nucleicos

- Agarose ultrapura, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).
- Brometo de etídio, Merck (São Paulo, Brasil).
- Sistema de sequenciamento *BigDye*[®] Terminator v3.1 Cycle sequencing kit, Applied Biosystems[®] (Foster City, CA, EUA).

3.1.4 Construção de vetores dicistrônicos

- *FastDigest XbaI*, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- *FastDigest SmaI*, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- *FastDigest EcoRI*, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- T4 DNA Ligase, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- Taq DNA Polimerase, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).
- Sistema para extração de DNA plasmídial, Nucleobond® Xtra Midi (Duren, Alemanha).

3.1.4.1 Vetores

- Vetor pEDdc, fornecidos gentilmente, mediante “Material Transfer Agreement”, pelo Dr. C. R. Wood (Genetics Institute, Cambridge, MA, EUA), com marcadores gênicos DHFR (Dihidrofolato redutase) e ADA (Adenosina deaminase).

3.1.4.2 Reagentes químicos

- Ácido acético glacial P.A., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Ácido clorídrico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido bórico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido etilenodiamino tetra-acético P.A., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Cloreto de sódio, Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio monobásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio dibásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Glicerol, Merck (São Paulo, Brasil).
- Tris, Sigma (St. Louis, MO, EUA).

3.1.4.3 Material plástico estéril

- Pipetas de 1, 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA).

- Placas de petri de 10 cm de diâmetro, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Sistema de filtração de 500 mL, 0,22µm, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Tubos criogênicos de 2 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Tubos para centrífuga de 15 e 50 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Tubos eppendorf de 0,5 e 1,5 mL (Hamburgo, Alemanha).

3.1.4.4 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético com 5 posições Bell-enniun[®], Bellco (Vineland, NJ, EUA).
- Agitador magnético modelo 258, Fanen (São Paulo, Brasil).
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil).
- Autoclave horizontal, modelo speedclave II 12L, Odontobras (São Paulo, Brasil).
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich. Suíça).
- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich. Suíça).
- Banho-maria, modelo 146, Fanen (São Paulo, Brasil).
- Câmara de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha).
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super Speed RC – 28, Sorvall (Newtown, Connecticut, EUA).
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5810R, Eppendorf, Alemanha.
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil).
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Espectrofotômetro, modelo Ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia).
- Fluxo laminar classe II A/B, modelo 1140, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).

- Fotodocumentador, modelo Minibis Pro, DNR Image systems, (Jerusalém, Israel).
- Frascos com volume nominal de 250 mL, Bellco (Vineland, NJ, EUA).
- Freezer -20 °C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil).
- Freezer -40 °C, modelo AB240, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Freezer -80 °C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Leitor de microplacas modelo Original Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, EUA).
- Medidor digital de pH, modelo 420, Orion (Boston, MA, EUA).
- Micro-centrífuga, modelo 5415P, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha).
- NanoDrop, modelo N 2000 (West Virginia, DE, EUA)
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Locator Jr., Thermolyne (Dubuque, IA, EUA).
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).
- Termociclador Veriti 96 poços, Applied Biosystems® (Foster City, CA, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta das hipófises

Sete hipófises foram processadas em colaboração com a Embrapa Amazônia Oriental e seis hipófises foram obtidas a partir de animais sexualmente maduros (>30kg/100-140cm) adquiridos da empresa Aquacultura Brasil Equipamentos e Serviços Ltda (São João da Boa Vista, São Paulo, Brasil) através de decapitação, removendo imediatamente a glândula hipofisária, armazenando-a em um reagente de estabilização de RNA (RNA Later® Solution - Life Technologies) e transportando-a para o IPEN-CNEN/São Paulo, tornando assim possível a realização de análises relacionadas à subunidade α e β do hormônio luteinizante de pirarucu.

3.2.2 Obtenção dos genes das subunidades α e β do ag-LH

3.2.2.1 Extração de RNA total

Diferentes hipófises de aproximadamente 70-100 mg tiveram seu RNA total extraído com auxílio do kit de extração Purelink® total RNA Mini purification (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), armazenando a -70°C até o processamento. Para a confirmação da integridade do material foi realizado um gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (1mg/mL).

3.2.2.2 Construção de iniciadores (“primers”) específicos e não específicos

Inicialmente, pares de *primers* sense e antisense foram desenhados para ambas subunidades baseados na análise de regiões conservadas das sequências de diferentes espécies de peixes, obtidas através do GenBank. Todos “primers” foram desenhados utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 (Hall *et al.* 1999)

Para o GTH α , 13 pares de primers não específicos (“consenso”) foram obtidos através de regiões conservadas de 17 espécies (TAB.1). Já para o LH β , seis pares de primers (“consenso” e degenerados) foram desenhados baseados nas regiões conservadas de 25 espécies de peixes (TAB.2)

Para a obtenção das subunidades α e β do ag-LH, foram utilizados 14 *primers* diferentes. Esses oligonucleotídeos podem ser observados na Tabela 3.

TABELA 1. Espécies de peixes utilizadas para desenhar os *primers* do GTH α .

Ordem	Nome	Número de acesso
Synbranchiformes	<i>Monopterus albus</i>	JN381163
Perciformes	<i>Sebastes schelegelii</i>	AY609078
	<i>Epinephelus coioides</i>	AF507939
	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	EF605275
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	BK005582
	<i>Solea senegalensis</i>	EF617343
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	AF268692
Cyprinodontiformes	<i>Fundulus heteroclitus</i>	U12923
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	S77059
	<i>Oncorhynchus masou</i>	S69273
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AB050834
Cypriniformes	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	X61050
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	GU218060
	<i>Carassius auratus</i>	AY800267
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	AF112190
Anguilliformes	<i>Anguilla marmorata</i>	FJ4900345
Acipenseriformes	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	EU656137

TABELA 2. Espécies de peixes utilizadas para desenho dos *primers* do LHβ.

Ordem	Nome	Número de acesso
Acipenseriformes	<i>Acipenser baeri</i>	AJ251656
	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	AY333426
	<i>Acipenser sinensis</i>	EU523733
Anguilliformes	<i>Anguilla japonica</i>	AB175835
	<i>Anguilla australis</i>	AB605268
	<i>Anguilla marmorata</i>	AF395605
	<i>Anguilla celebesensis</i>	AF395602
	<i>Anguilla rostrata</i>	AF395606
	<i>Anguilla Anguilla</i>	AF395598
	<i>Anguilla reinhardtii</i>	AF395600
	<i>Anguilla australis</i>	AF395601
	<i>Anguilla bicolor bicolor</i>	AF395599
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	AF112192
	<i>Silurus meridionalis</i>	AY973946
	<i>Hemibagrus nemurus</i>	KF934190
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	AY424305
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	EF565171
	<i>Pimephales promelas</i>	DQ242617
	<i>Carassius auratus</i>	AY800267
Scorpaeniformes	<i>Sebastes schlegeli</i>	AY609080
Perciformes	<i>Epinephelus merra</i>	AB525771
	<i>Epinephelus fasciatus</i>	HM030762
	<i>Epinephelus bruneus</i>	EF583920
	<i>Thunnus thynnus</i>	EF205591
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i>	HM768314

TABELA 3. *Primers* utilizados na clonagem do GTH α e do LH β de *A. gigas*.

Número	Direção	Nome	Sequência
<i>Primer 1</i>	<i>Sense</i>	GTH α consenso 1	5' CAT GGG CTG CTG CTT CTC 3'
<i>Primer 2</i>	<i>Antisense</i>	GTH α consenso 2	5' CTC TTT GGT ATG TCT GAC G 3'
<i>Primer 3</i>	<i>Sense</i>	LH β degenerado 1	5' CTG GTG TTY CAR ACM WCC ATC 3'
<i>Primer 4</i>	<i>Antisense</i>	LH β degenerado 2	5' AGT CMG ASG TGT CCA TKG TG 3'
<i>Primer 5</i>	<i>Antisense 5'</i> RACE	agGTH α -1	5' TTT GCT GTT CTG CCT TA 3'
<i>Primer 6</i>	<i>Antisense 5'</i> RACE	agGTH α -2	5' CTT GTG ATA GTA GCA GGT GTT G 3'
<i>Primer 7</i>	<i>Sense 5' RACE</i>	AAP (kit)	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG 3'
<i>Primer 8</i>	<i>Sense 5' RACE</i> ou <i>Antisense 3'</i> RACE	AUAP (kit)	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'
<i>Primer 9</i>	<i>Antisense 3'</i> RACE	AP (kit)	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T 3'
<i>Primer 10</i>	<i>Sense 3' RACE</i>	agGTH α -3	5' CAT GGG CTG CTG CTT CTC 3'
<i>Primer 11</i>	<i>Sense 3' RACE</i>	agLH β -1	5' GGG CGT GAG GTA CGA GA 3'
<i>Primer 12</i>	<i>Antisense 5'</i> RACE	agLH β -2	5' CAT TGA GGG AAC AAA ACT 3'
<i>Primer 13</i>	<i>Antisense 5'</i> RACE	agLH β -5	5' TGA TAT TTA GGG TTC GGG TTA GTT C 3'
<i>Primer 14</i>	<i>Sense</i>	agLH β -5'UTR	5' TAT CTC GGC TGC CGC TTG TT 3'

3.2.3 Transcrição Reversa pela Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR)

RNA total (~0.25µg) foi transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) utilizando o *kit GoScript® Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WIS, USA). Após a adição de Oligo-dT e Random primer, a reação foi incubada à 70°C por 5 minutos. A *GoScript® Reverse Transcriptase* foi adicionada e o anelamento foi feito a 25 °C por 5 min, seguido da extensão final a 42 °C por uma hora e de inativação da enzima a 70 °C por 15 min. Posteriormente, o cDNA obtido foi utilizado em reações de PCR.

3.2.4 Reação em cadeia de Polimerase (PCR) para obtenção de uma primeira sequência específica parcial

Para realização do PCR foi utilizado como molde, o cDNA proveniente da técnica de RT-PCR, primers sense e antisense para GTH α (#1 e #2, TAB 3) e para LH β (#3 e #4, TAB 3) na concentração de 10 mM e 5 U de Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Life Technology, Carlsbald, CA USA). A reação foi colocada em um termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA).

Primeiramente foi realizada uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos, sendo: desnaturação a 94 °C por 30s; anelamento por 30 s a 45 °C (GTH α) e 57 °C (LH β) e extensão a 68 °C por 1min. A extensão final foi realizada a 68 °C por 5 min e a reação foi colocada à 4 °C até a análise em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (1mg/mL).

3.2.5 Rápida Amplificação das Extremidades Finais (RACE) do cDNA para GTH α

A sequência relativa à GTH- α foi obtida através da técnica de 3' e 5' RACE (Life Technologies ®) seguindo as instruções do fabricante.

Inicialmente foi realizado o sistema 3'-RACE (FIG.3) onde 0,5-1,0 μ g de RNA mensageiro (mRNA) foi adicionado, juntamente com 10pmol de um primer adaptador (#9, TAB. 3) e 200U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies), para a síntese da primeira fita de cDNA. Um PCR foi realizado em seguida, utilizando um *primer* sense específico de GTH α (#10, TAB. 3), juntamente com o primer AUAP (#8, TAB.3), como antisense. A reação foi colocada em um termociclador para realização da desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para a desnaturação do cDNA, a 55°C por 30 segundos para o anelamento dos *primers* e a 72°C por 60 segundos para a extensão. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos e a reação foi mantida a 4°C até a análise em gel de agarose.

Para a reação de 5'-RACE (FIG.4) 0,8-1,5 μ g de RNA total foram reversamente transcritos com 200U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies) utilizando um *primer* específico de GTH α (#5, TAB.3) de acordo com as instruções do fabricante. Após essa etapa, foi adicionada RNase H para a digestão da fita de RNA e em seguida a fita simples de cDNA foi purificada e caudada através da enzima desoxinucleotídeo transferase. O PCR foi realizado utilizando um *primer* ancorador do kit, conhecido como AAP (#7, TAB.3) juntamente com um segundo *primer* específico antisense de GTH α (#6, TAB.3). Uma desnaturação inicial foi realizada durante 2 minutos a 94°C e 35 ciclos foram programados nas seguintes condições: 94°C por 60 segundos para a desnaturação das fitas, 55°C por 60 segundos para o anelamento dos *primers*, 72°C por 2 minutos para a extensão, seguindo um único ciclo de 72°C por 7 minutos para a extensão final.

FIGURA 3. Esquema das principais etapas da técnica de 3'RACE. Fonte: protocolo do kit 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0. <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home.html>.

Um segundo PCR foi realizado utilizando como fita molde o produto obtido através da técnica de 5'-RACE. Essa nova amplificação é conhecida como Nested-PCR e tem como objetivo aumentar a quantidade de produto pós-PCR. Para sua realização, a reação foi submetida às mesmas temperaturas e ciclos já descritos.

FIGURA 4. Esquema das principais etapas da técnica de 5' RACE. Fonte: protocolo do kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends", Version 2.0. <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home.html>>.

3.2.6 Rápida amplificação das extremidades finais do cDNA (RACE) para LH β

Primeiramente, foi realizado o 3'-RACE onde 0,5-1,0 μ g de RNA mensageiro (mRNA) foram reversamente transcritos pela adição de 200U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies), juntamente com 10 pmol de primer adaptador (#9, TAB.3) fornecido pelo kit, obtendo assim uma fita simples de cDNA. Após uma desnaturação inicial de 3 min à 94°C, foi adicionado um *primer* sense específico de LH β (#11, TAB.3) juntamente com um *primer* AUAP (#8, TAB.3), antisense, proveniente do kit. Foram programados 35 ciclos, iniciados pela desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 62.2°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Um último ciclo foi realizado para extensão final a 68°C por 5 minutos.

Para a reação 5'-RACE 0,5-1,0 μ g de RNA total foram reversamente transcritos com 200U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies) utilizando um *primer* específico de LH β (#12, TAB.3) de acordo com as instruções do fabricante. Após essa etapa, foi adicionada RNase H para a digestão da fita de RNA. Em seguida a fita simples de cDNA foi purificada e caudada através da enzima desoxinucleotídeo transferase. O PCR foi realizado utilizando um *primer* ancorador, conhecido como AAP (#7, TAB.3) juntamente com um segundo *primer* específico antisense de LH β (#13, TAB.3). Uma desnaturação inicial foi realizada durante 2 minutos a 94°C e 35 ciclos foram programados nas seguintes condições: 94°C por 60 segundos para a desnaturação das fitas, 61.7°C por 60 segundos para o anelamento dos *primers*, 72°C por 2 minutos para a extensão, seguindo um único ciclo de 72°C por 7 minutos para a extensão final.

3.2.7 Confirmação da sequência total de ag-GTH α e ag-LH β

Para a confirmação da sequência total foram realizadas outras reações de PCR utilizando a primeira fita simples de cDNA obtida durante o sistema de 3'-

RACE juntamente com um *primer* específico desenhado na região 5'UTR de cada subunidade e um primer AUAP, proveniente do kit de 3'-RACE.

As condições do PCR foram as mesmas descritas para o 3'RACE porém, como os *primers* utilizados para confirmação são diferentes dos utilizados anteriormente, as temperaturas de anelamento foram alteradas, sendo 60°C para GTH α e 68°C para LH β .

3.2.8 Análise em gel de agarose

O cDNA obtido através das técnicas anteriormente descritas foi analisado em gel de agarose na concentração de 1,2%. A agarose foi dissolvida em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) na concentração de 1X e aquecida por 45 segundos.

Após o resfriamento da solução, foi adicionado 1mg/ μ L de brometo de etídio para permitir a visualização da banda de interesse e todo conteúdo foi despejado em uma cuba própria para eletroforese, permanecendo até sua completa polimerização. O marcador de pares de base foi adicionado ao primeiro poço seguido das amostras a serem estudadas. Ambos foram submetidos a uma corrente elétrica de 60 volts durante 60 minutos e visualizados em luz ultravioleta (UV).

3.2.9 Purificação enzimática do produto pós-PCR

Para purificar os produtos proveniente das reações de PCR foram utilizados 4 μ L do reagente *ExoSap-IT* (Affymetrix- US, Cleveland, Ohio, EUA) em 10 μ L do produto de PCR.

A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos para degradação dos *primers* e nucleotídeos, seguida de uma incubação final a 80°C por 15 minutos, para a inativação enzimática da *ExoSap-IT*.

3.2.10 Quantificação dos ácidos nucleicos

A quantificação e análise de pureza dos ácidos nucleicos foram realizadas através de espectrofotometria, utilizando o equipamento *NanoDrop™ 1000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), onde 1 µL de amostra pós-PCR é adicionado ao pedestal de leitura. A quantidade de ácidos nucleicos presente na amostra é fornecida em ng/µL e os parâmetros de pureza podem ser calculados através do comprimento de onda a 260 e 280nm (razão 260/280).

3.2.11 Sequenciamento das amostras de cDNA obtidas

Para sequenciar as amostras de GTH α , foram montadas alíquotas no volume total de 7,5 µL, contendo aproximadamente 0,2 µg de cDNA, acrescidas de seus respectivos primers em 5 pmoles/µL. As alíquotas foram enviadas para o Centro De Estudo do Genoma Humano (CEGH), localizado na Universidade de São Paulo (USP) onde foi realizado o sequenciamento no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies – Applied Biosystems). Esse sistema possibilita a análise de DNA de 48 capilares, utilizando como leitura uma reação preparada para o sequenciamento realizada através do *BigDye® v3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). As sequências são analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 e o resultado enviado via e-mail.

Já as amostras de LH β , foram enviadas para o Instituto de Química da USP (IQ), onde foi realizado o sequenciamento utilizando o sequenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Life Technologies - Applied Biosystems), porém a reação de sequenciamento utilizando *BigDye® v3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* foi preparada em nosso laboratório, onde aproximadamente 0,2 µg de cDNA, 1 µL de *primer* a 10mM, 3µL de tampão de sequenciamento foram adicionados a um tubo de 0,2 mL e submetidos a termociclagem programada nas seguintes condições: 96°C por 2 minutos para a denaturação inicial; 35 ciclos a 96°C por 45 segundos para a denaturação, 58°C por 30 segundos para anelamento e 60°C por 4 minutos para a extensão. Após o PCR, o DNA foi precipitado com 25µL do cocktail de precipitação (etanol 100%; acetato de sódio 3M ph 5,3 e glicogênio 1mg/mL), submetido a centrifugação de 4.000 rpm por 30 minutos e a aquecimento a 96°C durante 3 minutos para

secagem, sendo posteriormente estocado a -20°C em recipiente protegido da luz até o envio para o sequenciamento.

3.2.12 Análise Filogenética

Para a análise filogenética da subunidade α , a sequência de aminoácidos correspondente ao peptídeo maduro foi comparada com outras 37 sequências homólogas retiradas do *GenBank* ou publicada em artigos científicos. A árvore filogenética e análises relacionadas foram construídas com auxílio do programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011), utilizando um suporte filogenético (*bootstrap*) de 1000 réplicas e baseando-se no Método de Proximidade dos Vizinhos (*Neighbor-Joining*) (Saitou e Nei 1987), onde três espécies de Acipenseriformes foram utilizadas para o enraizamento, como grupo externo (*outgroup*). A distância molecular evolutiva foi corrigida pelo Método de Poisson (Kimura e Ohta 1979).

Para o LH- β , a análise filogenética foi realizada através do programa de alinhamento MUSCLE (Edgar 2004), utilizando sequências de aminoácidos do peptídeo maduro de outras 40 espécies de peixes obtidas a partir do *GenBank*. (TAB.4). O alinhamento e o cálculo de identidade foram realizados através do programa *Geneious* 5.5.6. Para a construção e busca do melhor modelo de árvore filogenética foi utilizado o software MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). O alinhamento de aminoácidos foi utilizado para gerar uma árvore pelo método *Neighbor-Joining* (Jones *et al.* 1992).

As sequências de cDNA de ambas as subunidades beta (FSH e LH) foram concatenadas para gerar outra árvore filogenética baseada nos métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança, aplicando o modelo HKY (Hasegawa *et al.* 1985), com parâmetro Gamma = 1.34. O suporte filogenético foi obtido pelo método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas, foram utilizadas três espécies de Aciperceriformes como *outgroup*.

TABELA 4. Espécies de peixes e relativo número de acesso no *GenBank* para as sequências utilizadas na análise filogenética de LHβ.

Organismo	LH		
	Nucleotídeo (mRNA)	Aminoácido	
<i>Arapaima gigas</i>	-----	-----	Osteoglossomorpha, Osteoglossiformes, Arapaimidae
<i>Acipenser baerii</i>	AJ251656	CAB93502	Chondrostei, Acipenseriformes, Acipenseridae
<i>Acipenser schrenckii</i>	AY575921	AAS92239	Chondrostei, Acipenseriformes, Acipenseridae
<i>Acipenser sinensis</i>	EU523733	ACB29495	Chondrostei, Acipenseriformes, Acipenseridae
<i>Anguilla anguilla</i>	X61039	CAA43374	Elopomorpha, Anguilliformes, Anguillidae
<i>Anguilla japonica</i>	AB175835	BAD14302	Elopomorpha, Anguilliformes, Anguillidae
<i>Anguilla marmorata</i>	FJ490347	ACK87153	Elopomorpha, Anguilliformes, Anguillidae
<i>Conger myriaster</i>	AB045158	BAB97391	Elopomorpha, Anguilliformes, Congridae
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	AB603807	BAK39639	Ostariophysi, Cypriniformes, Cobitidae
<i>Carassius auratus</i>	D88024	BAA13531	Ostariophysi, Cypriniformes, Cyprinidae
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	EF565171	ABQ51327	Ostariophysi, Cypriniformes, Cyprinidae
<i>Danio rerio</i>	AY424304	AAR84283	Ostariophysi, Cypriniformes, Cyprinidae
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	EF565164	ABQ42715	Ostariophysi, Cypriniformes, Cyprinidae
<i>Pimephales promelas</i>	DQ242617	ABB51645	Ostariophysi, Cypriniformes, Cyprinidae
<i>Clarias gariepinus</i>	X97761	CAA66359	Ostariophysi, Siluriformes, Clariidae
<i>Ictalurus punctatus</i>	AF112192	AAG32156	Ostariophysi, Siluriformes, Ictaluridae
<i>Silurus meridionalis</i>	AY973946	AA42269	Ostariophysi, Siluriformes, Siluridae
<i>Coregonus autumnalis</i>	L23431	AAA68207	Protacanthopterygii, Salmoniformes, Salmonidae,
<i>Brachymystax lenok</i>	AY515501	AAR99811	Protacanthopterygii, Salmoniformes, Salmonidae
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AB050836	BAB17687	Protacanthopterygii, Salmoniformes, Salmonidae
<i>Gadus morhua</i>	DQ402374	ABD62884	Paracanthopterygii, Gadiformes, Gadidae
<i>Odontesthes bonariensis</i>	AY319833	AAP85607	Acanthopterygii, Atheriniformes, Atherinopsidae
<i>Fundulus heteroclitus</i>	M87015	AAB59963	Acanthopterygii, Cyprinodontiformes, Fundulidae
<i>Trichogaster trichopterus</i>	AF157631	AAD51935	Acanthopterygii, Perciformes, Osphronemidae
<i>Trachurus japonicus</i>	KC787605	AGO59025	Acanthopterygii, Perciformes, Carangidae
<i>Channa maculata</i>	AY447037	AAS01609	Acanthopterygii, Perciformes, Channidae
<i>Haplochromis burtoni</i>	HQ147565	ADQ42414	Acanthopterygii, Perciformes, Cichlidae
<i>Oreochromis niloticus</i>	AY294016	AAP49576	Acanthopterygii, Perciformes, Cichlidae
<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	AB300391	BAF81901	Acanthopterygii, Perciformes, Labridae
<i>Amphiprion melanopus</i>	FJ868868	ACR08088	Acanthopterygii, Perciformes, Pomacentridae
<i>Dicentrarchus labrax</i>	AF543315	AAN40507	Acanthopterygii, Perciformes, Moronidae
<i>Morone saxatilis</i>	L35096	AAC38019	Acanthopterygii, Perciformes, Moronidae
<i>Epinephelus coioides</i>	AF507939	AAM28896	Acanthopterygii, Perciformes, Serranidae
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	EF605276	ABQ96864	Acanthopterygii, Perciformes, Sparidae
<i>Pagrus major</i>	AB028213	BAB18564	Acanthopterygii, Perciformes, Sparidae
<i>Scomber japonicus</i>	JF495133	AEN14605	Acanthopterygii, Perciformes, Scombridae
<i>Thunnus thynnus</i>	EF205591	ABP04050	Acanthopterygii, Perciformes, Scombridae
<i>Paralichthys olivaceus</i>	AB042423	BAB47388	Acanthopterygii, Pleuronectiformes, Paralichthyidae
<i>Solea senegalensis</i>	EU100410	ABW81404	Acanthopterygii, Pleuronectiformes, Soleidae
<i>Sebastes schlegelii</i>	AY609080	AAU14142	Acanthopterygii, Scorpaeniformes, Sebastidae
<i>Monopterus albus</i>	EU840258	ACF70665	Acanthopterygii, Synbranchiformes, Synbranchidae

3.2.13 Inserção do cDNA da cadeia α em vetor de expressão dicistrônico

3.2.13.1 Obtenção da região codificadora de GTH α

Foi realizado um PCR a partir de um molde de cDNA simples fita estocado a -20 °C e obtido anteriormente pela técnica de 3'RACE, juntamente com *primers* contendo sítios de restrição específicos em suas extremidades a serem utilizadas para a inserção do gene no vetor de expressão. Para isso, as enzimas utilizadas foram a XbaI e EcoRI. (TAB. 5).

O termociclador foi programado em 35 ciclos, nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos para uma denaturação inicial, 60°C por 30 segundos para o anelamento e 68°C por 60 segundos para extensão. A extensão final foi realizada a 68°C por 5 min. Após essa etapa, os primers e ddNTPs remanescentes foram degradados enzimaticamente pela ação da *ExoSap-it*.

TABELA 5. *Primers* contendo sítios de restrições (em vermelho) utilizados para amplificação da região codificadora de GTH α de *A.gigas*

Enzima	Subunidade	Oligonucleotídeo
XbaI	GTH α <i>sense</i>	5' GCT CTA GAA TGA GCT ACA CAG GAA AAC 3'
EcoRI	GTH α <i>antisense</i>	5' GGA ATT CTT ATG ACT TGT GAT AGT AGC AGG 3'

3.2.13.2 Clivagem do vetor de expressão aberto e do inserto que codifica o GTH α com enzimas de restrição

Durante o preparo do inserto, aproximadamente 250 ng de cDNA foram digeridos com as respectivas enzimas, incubando a 37°C por 20 minutos e inativando a 65°C por 10 minutos.

Aproximadamente 1µg do vetor de expressão pEDdc foi duplamente digerido com as enzimas de restrição de *XbaI* e *EcoRI*. As reações foram incubadas a 37°C por 20 minutos, inativando a 65°C por 10 minutos.

3.2.13.3 Ligação do inserto no vetor de expressão

Para reação de ligação, 1µL de T4 ligase (*Thermo Scientific*®) foi adicionado a aproximadamente 107 ng de vetor pEDdc previamente clivado e 35 ng do inserto em questão, obedecendo à proporção 3:1 de vetor/inserto. A reação foi incubada a 22°C por 20 minutos seguindo-se de um ciclo de 65°C por 15 minutos para a inativação enzimática.

3.2.13.4 Transformação pelo método de choque térmico

Toda reação de ligação foi adicionada a 200µL de *E.coli* DH5α (4×10^8 cels/mL), colocando no gelo durante 20 minutos. Após esse tempo, a reação foi transferida imediatamente para o banho-maria, incubando a 37°C por 2 minutos. Em capela, foram adicionados 800µL de meio Luria-Bertani (LB) sem ampicilina, em condições de esterilidade, e novamente a reação foi incubada a 37°C, dessa vez, porém, com agitação menor que 50 rpm, durante 1 hora.

Aproximadamente 200µL do produto (reação) obtido foram semeados com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio LB com 0.1 mg/µL de ampicilina. A mesma coisa foi feita com um controle negativo (sem inserto) da mesma reação. As placas foram colocadas em estufa a 37°C durante 16 horas.

3.2.13.5 Seleção de colônias para detecção de clones positivos

Após as 16 horas de incubação foram selecionadas 8 colônias, aleatoriamente, com auxílio de uma ponteira e dispensadas em um tubo falcon de

15 mL contendo 6 mL de meio LB acrescido de ampicilina (0,1 mg/ μ L) e incubando a 37°C com agitação de 150 rpm, durante 16 horas.

As alíquotas apresentaram-se turvas e foram diluídas na proporção 1:10 para serem utilizadas como molde de DNA em uma reação de PCR, utilizando *primers* específicos para os vetores de expressão em questão.

3.2.13.6 Midi preparação de DNA plasmidial

Uma colônia derivada da reação foi colocada em 150 mL de meio LB acrescido de ampicilina a 0,1 mg/ μ L, incubando a 37°C por 16 horas com agitação em 150 rpm. Este inóculo foi centrifugado a 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C e a extração foi realizada seguindo as instruções de um kit para extração de DNA, próprio para plamídeos (Macherey-Nagel GmbH & CO. KG). O DNA obtido foi sequenciado no Instituto de Química para verificar a orientação do inserto no vetor de expressão. O mesmo foi feito com uma colônia derivada do controle.

4 RESULTADOS

4.1 Extração de RNA total

O RNA total de hipófises armazenadas em nitrogênio líquido foi extraído e sua integridade foi observada em gel de agarose 1,2%, devido à presença de bandas íntegras na altura esperada para as subunidades 28s e 18s do RNA ribossomal (FIG.5)

FIGURA 5. Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. O primeiro poço representa o marcador de peso molecular e os demais poços as bandas 28s e 18s do RNA ribossomal de seis hipófises diferentes de *A. gigas*.

4.2 Obtenção do cDNA de GTH α de *Arapaima gigas*

Todos os dados relativos ao GTH α foram publicados na revista Fish Physiology and Biochemistry (Faria et al. 2013)

4.2.1 Obtenção de uma primeira sequência parcial de ag-GTH α

Uma sequência parcial da subunidade α foi obtida através de um PCR inicial utilizando *primers* sense e antisense não específicos (“consenso”), n.1, 2 (TAB.3), desenhados a partir de regiões conservadas de sequências de outras espécies de peixes (TAB.1). Uma única banda de aproximadamente 400 pb foi identificada em gel de agarose 1,2% (FIG.6) e, posteriormente, seu sequenciamento indicou que tratava-se da parte central do gene esperado, apresentando alta similaridade com sequências análogas de outras espécies de peixes.

FIGURA 6. Análise em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (1mg/mL) do cDNA de GTH α (poço 1) proveniente de um PCR realizado utilizando *primers* “consenso” baseados nas sequências de GTH α de outras espécies de peixes. O marcador de peso molecular de 100 pb pode ser observado no poço M.

4.2.2 Utilização do sistema RACE para obter a sequência completa do ag-GTH α

Para o 5'-RACE, utilizou-se um *primer* antisense específico de *Arapaima gigas* desenhado com base na sequência obtida previamente através de PCR. Foi obtida uma fita simples que copiou toda a região 5' do gene. Em seguida, utilizando outro *primer* antisense específico de *A.gigas*, juntamente com dois outros *primers* senses provenientes do kit, foi obtida uma sequência parcial que inclui toda extremidade 5' do gene.

Para o 3'-RACE utilizou-se um *primer* antisense proveniente do kit, que ligou-se a cauda poli-A do RNA mensageiro (RNAm), codificando uma nova fita simples de cDNA. Em seguida, utilizando um *primer* sense específico desenhado

com base na sequência central identificada previamente e um *primer* antisense proveniente do kit, que se liga à cauda poly-A, obteve-se a sequência restante da região 3' do gene.

4.2.3 Confirmação do cDNA de ag-GTH α

O material derivado de sete diferentes hipófises foi utilizado como molde em PCRs para a confirmação da sequência de GTH α . A sequência obtida foi comparada e alinhada com a sequência de outras espécies de peixe, e assim, foi confirmada a obtenção da subunidade α de *A.gigas*.

A sequência de GTH α (FIG.7) apresenta um comprimento total de 767 pb, incluindo uma cadeia poli-A de 20 adeninas. Foi identificada uma região codificante (ORF) de 348 pb, iniciando com o primeiro códon ATG na posição 58 e o códon de parada ("stop") na posição 403. O sinal de poliadenilação (ATTAAA) foi localizado 18 pb antes da cauda poli-A. A região codificante traduz um peptídeo de 115 aminoácidos, com um sítio de clivagem do peptídeo sinalizador, calculado pelo *software* SignalP 4.1 (Petersen *et al.* 2011), situado entre o aminoácido 24 e 25. Com isso, temos um peptídeo sinalizador de 24 aminoácidos e um peptídeo maduro de 91 aminoácidos que, quando alinhado com outras espécies de peixe, apresenta a conservação de 10 resíduos de cisteínas, 3 prolinas e dois supostos sítios de N-glicosilação identificados entre os aminoácidos 51-53 (NIT) e os aminoácidos 77-79 (NHT).

A sequência completa de nucleotídeos e aminoácidos foi depositada no GenBank e está disponível para consulta pelo código de acesso KJ755358 para nucleotídeos e AIG51239.1 para aminoácidos.

```

1 tgaacagctcactacaaaagtacagaaacctcccgtcactacgtatttgcaggcaccatg 60
61 agctacacaggaaaactgaccattgcatctgttctggcattactggccatcttacatatt 120
   S Y T G K L T I A S V L A L L A I L H I
121 gtagactctaatttcaatgtgggttgtgaagagtgcaaaacttaaggagaacaagtacttc 180
   V D S N F N V G C E E C K L K E N K Y F
181 tcaaggctgggagcaccatctttcagtgcattgggctgttgccttccagagcataccct 240
   S R L G A P I F Q C M G C C F S R A Y P
241 acacctctgaggtccaagaaaacaatgctggttcccaagaacataacatccgaggcaacg 300
   T P L R S K K T M L V P K N I T S E A T
301 tgctgtgtggctaaagaagtcaaacggctgatcacactgaacaacgtgagactggaaaac 360
   C C V A K E V K R L I T L N N V R L E N
361 cacacggactgtcactgcaacacctgctactatcacaagtcattaaggcagaacagcaaaa 420
   H T D C H C N T C Y Y H K S -
421 ctttattttaacctgatttgaaggtagattaaaaaatgacattggttgatttaattgtcat 480
481 tgtttttcatttcatagacgtaacatgctgaagactcattagactatacaaggaaaactg 540
541 tgtgatgtggtaatcttttgtgttagaaaaaagttctgaatagctcatcatattttcttaa 600
601 ttttttgttcatttacataaaaacagtactcacaagcaattaaagcggggaatcattagag 660
661 gcaatcttcagctggaaaattgtattgcattttgtcagtaccaacacaagctttcattta 720
721 cttattaaaagagccacataaaacatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 767

```

FIGURA 7. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do GTH α . **M**, metionina inicial; (NIT) e (NHT), sítios de glicosilação; **N**, primeiro aminoácido do peptídeo maduro; **C** cisteínas; **P** prolinas; **TAA**, stop codon; **attaaa**, sinal de poliadenilação; **aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**, cauda poli-A.

4.2.4 Alinhamento e porcentagem de identidade entre os GTH α de várias ordens

O alinhamento da sequência de aminoácidos com outros 34 teleósteos e três Acipenseriformes, pode ser observado na Figura 8, enquanto a Tabela 6 apresenta a porcentagem de identidade do GTH α com outras 11 ordens de peixes.

A sequência da subunidade α de *A. gigas* quando comparada com outras espécies, apresenta-se altamente conservada para os 10 resíduos de cisteínas, dois sítios de N-glicosilação e três prolinas.

Quando são calculadas as porcentagens de identidade podemos observar que a ordem dos Osteoglossiformes, referente ao *A. gigas*, apresenta um menor

nível de identidade com os Cyprinodontiformes e Gadiformes e o maior nível de identidade com os Cypriniformes, Anguilliformes e Siluriformes.

TABELA 6. Porcentagem de identidade entre peptídeos maduros de GTH α em diferentes ordens de peixes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Osteoglossiformes (1) ^a	100	87.1	88.1	89.5	88.1	75.7	67.4	55.0	55.0	70.0	63.6	62.8
2 Acipenseriformes (3) ^a		100	88.1	84.8	84.1	74.6	66.2	55.0	55.0	67.7	64.5	65.3
3 Anguilliformes (4) ^a			98.2	83.7	83.1	73.5	64.0	51.6	57.0	64.7	60.5	62.2
4 Cypriniformes (5) ^a				99.3	97.9	79.8	71.9	60.3	62.8	70.5	63.7	67.2
5 Siluriformes (2) ^a					96.5	79.0	71.7	60.3	61.6	70.0	63.6	67.7
6 Salmoniformes (4) ^a						87.4	63.0	58.9	56.4	62.2	61.1	65.3
7 Perciformes (11) ^a							93.3	81.6	58.4	94.4	83.6	88.2
8 Cyprinodontiformes (1) ^a								100	52.3	82.1	76.8	81.1
9 Gadiformes (1) ^a									100	57.7	54.0	57.7
10 Synbranchiformes (2) ^a										94.7	86.0	88.1
11 Pleuronectiformes (3) ^a											82.4	80.3
12 Tetraodontiformes (1) ^a												100

^a Número de espécies analisadas pertencentes a mesma ordem

FIGURA 8. Alinhamento da sequência de aminoácidos do ag-GTH α com as sequências de outras 37 espécies de peixes retiradas do GenBank.

4.2.5 Árvore filogenética com dados da sequência de aminoácidos de GTH α

A árvore filogenética, observada na Figura 9, foi construída utilizando três espécies de Acipenseriformes como grupo externo (enraizamento) e 34 sequências de outros teleósteos. Como “outgroup”, os Acipenseriformes foram escolhidos por serem os parentes mais próximos dos teleósteos, com sequência de GTH α divulgada no *GenBank*.

A árvore filogenética colocou os Osteoglossomorpha como grupo irmão dos Clupeocephala, enquanto os Elopomorpha (Anguilliformes) aparecem como grupo basal dos teleósteos, confirmando estudos anteriores de Arratia *et.al* (1991) e Hilton *et.al* (2003), porém divergindo de Patterson e Rosen (1977) que colocaram os Osteoglossomorpha como grupo mais basal dos teleósteos. Deve ser analisada uma maior diversidade de espécies para que seja possível chegar a uma definição que possua um maior suporte estatístico.

4.3.1 Obtenção de uma primeira sequência parcial para LH β

Uma sequência parcial do LH β foi obtida através de um PCR inicial utilizando *primers* degenerados sense e antisense número 3 e 4 (TAB.3), desenhados a partir de regiões conservadas de sequências de outras 25 espécies de peixes (TAB.2). Uma única banda de aproximadamente 300 pb foi identificada em gel de agarose 1,2% (FIG.10). Posteriormente, o resultado do seu sequenciamento comparado com o cDNA de LH β de outras espécies indicou tratar-se de uma sequência próxima a região 3' da mesma subunidade β de LH do pirarucu.

FIGURA 10. Banda de aproximadamente 300 pb relativa à primeira região parcial identificada no ag-LH β (poço 1). O marcador de peso molecular de 100 pb pode ser observado no poço M.

4.3.2 Utilização do sistema RACE para obter a sequência completa de ag-LH β

Para o 3'RACE, utilizou-se um *primer* antisense proveniente do kit, que ligou-se a cauda poli-A do RNAm, sintetizando uma nova fita simples de cDNA. Em seguida, utilizando um *primer* sense específico desenhado com base na sequência identificada previamente, próxima à região 3', e o *primer* antisense proveniente do kit, obteve-se uma banda única de aproximadamente 500 pb (FIG.11), referente a um produto de sequenciamento de 409 nucleotídeos correspondentes a região 3' do LH β de *A.gigas*.

FIGURA 11. Banda de aproximadamente 500 pb relativa à região 3' de ag-LH β . O marcador de peso molecular de 100 pb pode ser observado no poço M.

Para o 5'RACE, utilizou-se um *primer* antisense específico de *Arapaima gigas* desenhado com base na sequência obtida previamente. Foi obtida uma fita simples que copiou toda a região 5' do gene. Em seguida, utilizando outro *primer* antisense específico de *A.gigas* juntamente com dois outros *primers* sense provenientes do kit, foi obtida uma banda única de aproximadamente 700 pb (FIG.12) referente a um produto de sequenciamento de 624 nucleotídeos correspondentes à região 5' do LH β de *A.gigas*.

FIGURA 12. Banda de aproximadamente 700 pb relativa à região 5' de ag-LH β . O marcador de peso molecular de 100 pb pode ser observado no poço M.

4.3.3 Confirmação do cDNA de ag-LH β

Para confirmar a sequência total de nucleotídeos e aminoácidos do ag-LH β foi utilizado um novo *primer* sense específico, desenhado na extremidade 5' juntamente com um *primer* antisense proveniente do kit. As amostras utilizadas como molde foram as fitas simples de cDNA obtidas durante a primeira etapa de 3'-RACE de seis hipófises distintas.

A sequência de LH β (FIG.13) apresenta um comprimento total de 711 pb, incluindo uma cadeia poli-A de 18 adeninas. Foi identificada uma região codificante (ORF) de 426 pb, iniciando com o primeiro códon ATG na posição 47 (46 pb 5'-UTR) e terminando na posição 469. Também está presente uma região 3'UTR de 221 pb. O sinal de poliadenilação (AATAAA) foi localizado 18 pb antes da cauda poli-A. É interessante ressaltar que o sinal de poliadenilação ATATAA, de menor conservação, encontrado no GTH α (Faria *et al.* 2013), e confirmado no FSH β de *A.gigas*, não foi mantido na sequência obtida de LH β , sendo que o novo sinal de poliadenilação apresenta-se altamente conservados quando comparado com sequências de LH β de outras espécies (Sheets *et al.* 1990). A região codificante traduz um peptídeo de 141 aminoácidos, com um sítio de clivagem do peptídeo sinalizador, calculado pelo *software* SignalP 4.1 (Petersen *et al.* 2011), situado entre o aminoácido 24 e 25. Com isso, temos um peptídeo sinalizador de 24 aminoácidos e um peptídeo maduro de 117 aminoácidos que, quando alinhado com outras espécies de peixe, apresenta a conservação de 12 resíduos de cisteínas, 6 prolínas e um suposto sítio de N-glicosilação identificados entre os aminoácidos 10-12 (NQT), enquanto um segundo possível sítio de N-glicosilação foi perdido entre os aminoácidos 27-29 (alterado para QTT) do peptídeo maduro.

A sequência completa referente à subunidade β do hormônio luteinizante (LH β) de *A.gigas* foi depositada no *GenBank* (número de acesso: KJ741848).

```

1  tatctcgggtgccgcttgttgaacccctgggtatcattctgtgaggatgtcaccagtccc 60
    [M] S P V P
61  agcttgcacccctgctcacgttccctctccttgtgccatctcctggccccaacctgggcccgt 120
    A C T L L T F L S L C H L L A P T W A [V]
121 ctatctgcagccctgtgagccgatcaatcagaccatctccgtggagaaagagggctgtcc 180
    Y L Q P [C] E P I [N Q T] I S V E K E G [C] [P]
181 gaagtgcctggtgtttcagaccaccacctgcagcgggtcactgcatcactaaggagccagt 240
    K [C] L V F [Q T T] T [C] S G H [C] I T K E [P] V
241 ttacaagagccccctgtccatgttgtatcagcatgtgtgcacataccggggcgtgaggta 300
    Y K S P L S M L Y Q H V [C] T Y R G V R Y
301 cgagaccatccggctgccagactgtccacgtggggtggacccccacgtcacctaccgggt 360
    E T I R L [P] D [C] P R G V D [P] H V T Y [P] V
361 agcactcagctgcagctgcggcctctgcaccatggatacttctgactgcaccatcgagag 420
    A L S [C] S [C] G L [C] T M D T S D [C] T I E S
421 cttgcagccagacttctgtatcaaccagaggacccttctgtttgactattaggtgactgt 480
    L Q [P] D F [C] I N Q R T L L F D Y -
481 ggtggggatggtgtgctgggtacatgcatggggagcacagggatccccaaactgccccaa 540
541 cggaaccagtcctgtgtgctccctgatgtgttgcattgcctctcattcagccgacacaca 600
601 gcgcatagtcaacaaaacaaaatacagaactaaccggaaccctaataatcaaaccaagc 660
661 agataatggaataaagtgttgggtccctcaatgtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

FIGURA 13. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do LHβ de *A. gigas*. [M] metionina inicial; [NQT] sítios de glicosilação; [QTT], sítio de glicosilação perdido; [V], primeiro aminoácido do peptídeo maduro; [C], cisteínas; [P], prolinas; [aataaa], sinal de poliadenilação; [aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa], cauda poli-A.

4.3.4 Alinhamento e porcentagem de identidade entre os LHβ de várias ordens

O alinhamento da sequência de LHβ com outras 40 espécies de peixes pode ser observado na Figura 14. Há regiões altamente conservadas, bem como as 12 cisteínas encontradas que estão relacionadas com a formação de 6 pontes dissulfeto (Uchida *et al.* 2013), o sítio de N-glicosilação (NQT) e seis prolinas.

Já a Tabela 7 apresenta a porcentagem de identidade de LHβ com outras 12 ordens de peixes, onde a sequência de aminoácidos é menos variável do que a referente ao FSHβ, sugerindo que o LHβ parece mais conservado entre as espécies (Carvalho *et al.*, submetido para publicação).

A maior porcentagem de identidade de 75.6% foi com os Cypriniformes, enquanto o menor foi de 53.8%, com os Gadiformes, dados estes que reproduziram quase perfeitamente aqueles já encontrados para a subunidade

GTH α . Adicionalmente, ao comparar a identidade dos peptídeos maduros de ag-LH β e do LH β humano, obtivemos um valor de 66.7%.

TABELA 7. Porcentagem de identidade entre peptídeos maduros de LH β e FSH β de várias ordens de peixes. O LH β pode ser observado abaixo da linha diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Arapaima gigas</i>	-	51.5	60.9	51.6	53.0	44.1	33.0	37.6	37.4	36.3	35.7	36.4	35.0
2. <i>Acipenseriformes</i> (3)	55.6	-	48.7	44.7	49.4	39.0	27.8	35.2	33.9	33.4	32.0	32.4	33.3
3. <i>Anguilliformes</i> (4)	74.3	64.7	-	54.4	56.6	43.8	33.2	41.0	40.6	39.0	39.8	36.1	39.7
4. <i>Cypriniformes</i> (6)	75.6	63.4	77.8	-	66.6	47.0	33.6	40.0	37.9	39.7	40.4	40.8	39.1
5. <i>Siluriformes</i> (3)	74.9	61.3	75.7	80.2	-	44.8	35.5	40.4	38.0	40.5	41.3	37.9	39.8
6. <i>Salmoniformes</i> (3)	74.2	59.3	71.7	76.4	73.1	-	32.1	36.7	36.4	36.7	36.7	39.1	31.7
7. <i>Gadiformes</i> (1)	53.8	48.7	52.1	53.3	54.9	49.7	-	49.0	41.0	48.5	49.1	45.2	49.0
8. <i>Atheriniformes</i> (1)	57.6	46.6	53.0	56.6	58.5	57.1	59.8	-	60.0	58.1	57.3	51.9	59.4
9. <i>Cyprinodontiformes</i> (1)	55.1	47.5	52.1	54.8	54.8	51.6	59.0	70.7	-	53.9	49.5	49.0	58.5
10. <i>Perciformes</i> (14)	65.1	52.4	59.7	65.5	63.0	63.5	63.5	80.5	74.7	-	63.0	56.0	66.4
11. <i>Pleuronectiformes</i> (2)	59.7	50.4	55.4	61.3	60.7	59.1	60.2	76.7	69.0	79.5	-	56.7	66.6
12. <i>Scorpaeniformes</i> (1)	62.7	51.4	57.9	63.3	61.9	61.9	61.5	83.6	75.0	88.9	80.6	-	59.2
13. <i>Synbranchiformes</i> (1)	64.4	50.5	60.2	64.7	62.7	62.2	62.4	79.3	73.3	89.5	81.0	88.8	-

() Número em parênteses indica a quantidade de espécies analisadas em cada ordem

4.3.5 Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de aminoácidos e de nucleotídeos de LH β

Uma primeira árvore foi construída baseada na sequência de aminoácidos através do método de *neighbor-joining*, utilizando as sequências de aminoácidos de LH β de 41 espécies de peixes, incluído o *A.gigas* (FIG.15). Paralelamente, uma segunda árvore foi construída baseada nas sequências concatenadas de cDNA de LH β e FSH β , utilizando as mesmas 41 espécies de peixes (FIG 16). Ambas as árvores utilizaram três Acipenseriformes como *outgroup*, para o enraizamento da árvore.

Podemos considerar que as informações obtidas inicialmente com a árvore da subunidade alfa (GTH α) foram confirmadas, de modo que a superordem dos Osteoglossomorpha, que compreende o *A.gigas*, está posicionada como grupo irmão dos Clupeocephala. Já os Elopomorpha, que compreendem os Anguilliformes aparecem como grupo mais basal entre os teleósteos. Podemos observar, outrossim, que a árvore baseada na sequência de aminoácidos não apresentou uma boa definição filogenética especialmente no clado dos Acanthomorpha. A árvore baseada nas sequências concatenadas de cDNA de LH β e FSH β , apresentou uma definição melhor, provavelmente devido ao fato de ter, neste caso, uma maior riqueza de dados.

FIGURA 15. Árvore filogenética enraizada e não enraizada baseada na sequência de aminoácidos do LHβ. O método adotado foi o de *neighbor joining* e o *outgroup* são três espécies de Acipenseriformes.

FIGURA 16. Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas de cDNA de LH β e FSH β de 41 espécies de peixes, incluindo o *A.gigas*. Os Acipenseriformes foram utilizados como *outgroup*. Valores de bootstrap são apresentados acima (verossimilhança) e abaixo (máxima parcimônia).

5 DISCUSSÃO

5.1 Clonagem dos cDNA de ag-GTH α e de ag-LH β

O trabalho mais crítico, resolvido o qual todos os outros foram praticamente consequentes, foi a identificação inicial de uma região específica dos dois genes que constituem o ag-LH que, obviamente, nunca tinham sido sequenciados e que foi necessária para uma eficaz aplicação do 5'-RACE e 3'-RACE.

No caso do GTH α foram necessários 13 pares de primers “consenso” derivados de 8 ordens de teleósteos e de uma ordem de Chondrostei (Acipenseriformes), correspondentes a 17 espécies diferentes. De fato foram

necessárias aproximadamente 60 reações de cruzamentos entre estes primers para se chegar, finalmente, a um par (chamado depois de primers 1 e 2) que pudesse identificar uma única banda de 400 pb, que se revelou específica para o *A. gigas*.

No caso do LH β foram utilizados somente 6 pares de primers degenerados, derivados de 7 ordens e 25 espécies diferentes de peixes, um par dos quais (chamados posteriormente de primers 3 e 4), após aproximadamente 30 tentativas, identificou uma banda de 300 pb que resultou específica para o gene de ag-LH β .

O número de hipófises de *A. gigas* analisadas foram 7 no caso do GTH α e 6 para o LH β e sempre tivemos o cuidado de verificar que cada porção dos genes identificados fosse encontrada idêntica em pelo menos 3 animais diferentes.

5.2 Isolamento e análise do cDNA da subunidade ag-GTH α

Pela primeira vez foi sintetizada e analisada a sequência completa do cDNA que codifica a subunidade α das gonadotrofinas de *Arapaima gigas*. Comparando com as sequências dos peptídeos maduros, ou seja, sem peptídeo sinalizador, de outros peixes, foi encontrada uma alta identidade de aminoácidos com outros teleósteos (Cypriniformes, Anguilliformes e Siluriformes) e até com Chondrostei (Acipenseriformes), da ordem de 87,1 a 89,5%. A identidade mais baixa (55%) foi encontrada com Cyprinodontiformes e Gadiformes. O nível de identidade entre *A. gigas* e os Acanthomorpha (ver ordens de 7 a 11 na Tabela 5), variando de 55 a 70%, resultou similar àquela encontrada entre *A. gigas* e os vertebrados terrestres: 66,1% em comparação com o rato (*Rattus norvegicus*), 67,8% com o camundongo (*Mus musculus*) e 66,7% com o humano (*Homo sapiens*). A relação filogenética, portanto ajuda na interpretação da variação encontrada para o GTH α em peixes, indicando que uma subunidade relativamente bem conservada nas ordens basais dos teleósteos e dos Acipenseriformes, evoluiu gradativamente para os GTH α que estão presentes nos Acanthopterygii (ver ordens de 7 a 12 na Tabela 5) e Gadiformes.

A análise do ag-GTH α em relação a outras 34 espécies de teleósteos, confirmou a existência de quatro elementos particularmente conservados nos

peptídeos maduros. Estes são especificamente: 10 resíduos de cisteína responsáveis pela formação de 5 pontes dissulfeto, 2 sítios de glicosilação “N-linked” e 3 resíduos de prolina, possivelmente relacionados com a direção do esqueleto da estrutura proteica.

É conhecido que as cadeias de carboidratos presentes nos sítios de N-glicosilação, ou seja, ligadas à asparagina, regulam o processo de junção entre as subunidades e estimulam as funções que desencadeiam a ativação da proteína G e a síntese do segundo mensageiro, depois da ligação do hormônio ao seu receptor (Roch *et al.* 2009). As 12 ordens e 38 espécies analisadas, incluindo o *A. gigas* (Osteoglossiformes), apresentaram em geral as sequências NIT e NHT, assim providenciando dois sítios de glicosilação em suas subunidades α . A exceção foi o *Muraenox sinereus* (Anguilliformes), apresentando D no lugar de N na posição de AA56 e perdendo assim o primeiro sítio de glicosilação, enquanto o *Gadus morhua* (Gadiformes) apresentou Q no lugar de H na posição de AA86, mantendo o sítio de glicosilação (Fig. 4). O suposto sítio de clivagem para o peptídeo sinalizador apareceu entre o AA24 (S) e AA25 (N). Podemos observar a este respeito, que das 38 espécies reportadas na Fig. 4, 33 apresentaram uma tirosina (Y), 4 apresentaram outros aminoácidos (D,F,G,H) e somente uma espécie (*A. gigas*) apresentou asparagina (N) como suposto aminoácido inicial do peptídeo maduro de GTH α . A posição de clivagem também concorda com a maioria das posições relatadas na literatura, variando para os teleósteos de 18 a 28 AA.

O sinal de poliadenilação de ag-GTH α (ATTAAA), não é “consenso” em comparação com o sinal altamente conservado AATAAA presente nos vertebrados e normalmente localizado 15-25 nucleotídeos acima do sítio de poliadenilação. O sinal ATTAAA porém é encontrado também no esturjão russo, Striped bass, coho salmon e tilapia (Hassim *et al.* 1995; Dickey and Swanson 2000; Gur *et al.* 2001; Hurvitz *et al.* 2005). A sequência ATTAAA demonstrou-se, porém, a mutação mais moderada, sendo a variante natural mais comum e proporcionando um RNAm cuja eficiência de poliadenilação e de clivagem ainda é 70-80% daquela relativa ao DNA que contém o sítio “consenso” AATAAA (Sheets *et al.* 1990).

Existem poucos estudos relativos a hipóteses filogenéticas para a superordem dos Osteoglossomorpha, que sejam baseadas em dados moleculares. O'Neill *et al.* (1998) sugeriram não tratar-se de um grupo monofilético, com base na análise de uma forma de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Kumazawa e Nishida (2000) empregaram sequências derivadas dos genes b e ND2 de citocromo mitocondrial, chegando à conclusão que a família Arapaimidae (*Heteroticus niloticus* e *A. gigas*) forma um grupo irmão dos osteoglossídeos. Al-Mahrouki *et al.* (2001) isolaram e sequenciaram o cDNA da preproinsulina em quatro espécies de Osteoglossomorpha, mostrando não ser um grupo monofilético e sugerindo não tratar-se do grupo mais basal dos teleósteos vivos. Com base em 5 marcadores moleculares, Lavoué e Sullivan (2004) confirmaram porém, com forte argumentação, que os Osteoglossomorpha constituem um grupo monofilético. Mu *et al.* (2010), usando as sequências gênicas completas do citocromo b mitocondrial, esclareceram a estrutura genética e a relação existente entre quatro gêneros específicos da família Osteoglossidae. Por outro lado Han e Yu (2002), em estudo relativo à diversidade filogenética e evolução de GTH α em peixes, analisaram os cDNAs das enguias do brejo (duas espécies de Synbranchiformes) que foram comparados com outros 31 cDNAs de GTH α derivados de 5 ordens de peixes, nenhum dos quais, porém, pertencia à superordem dos Osteoglossomorpha.

O nosso estudo filogenético relativo à subunidade ag-GTH α estabeleceu uma hipótese comparando este peptídeo com aqueles de outras 34 espécies de teleósteos. Representa portanto 12 ordens e 38 espécies de peixes, incluindo os 3 Acipenseriformes que foram escolhidos como grupo externo por ser os parentes mais próximos dos teleósteos, para os quais são conhecidas as sequências de GTH α . Diferentemente de outros estudos que analisaram a topologia dos Osteoglossomorpha excluindo outros teleósteos ou os usando como grupo externo (Lavoué e Sullivan, 2004; Mu *et al.* 2010), o presente estudo se baseou em um grande número de teleósteos: 35 espécies. A árvore filogenética resultante colocou os Osteoglossomorpha como grupo irmão dos Clupeocéphala enquanto os Elopomorpha (Anguilliformes) apareceram como o grupo mais basal entre todos os teleósteos analisados, confirmando assim estudos anteriores realizados por Arratia (1991), Li e Wilson (1999) e Hilton (2003). Esta visão diverge da

tradicional que sempre colocou os Osteoglossomorpha como o grupo mais basal dos teleósteos vivos (Patterson e Rosen 1977). A nossa análise filogenética contribui portanto para a tentativa de identificar o grupo irmão de todos os teleósteos vivos (Arratia 2001), mesmo precisando investigar um maior número de amostras taxonômicas de Osteoglossomorpha, incluindo também outras regiões gênicas, para obter uma significância satisfatória.

5.3 Isolamento e análise do cDNA da subunidade ag-LH β

Os genes das duas subunidades β de FSH e LH derivam do mesmo gene ancestral, com divergência que ocorreu há aproximadamente 927 milhões de anos, depois que houve a separação dos animais das plantas (Li e Ford 1998; Kawauchi e Sower 2006; Uchida *et al.* 2013) e a comparação entre as sequências de ag-LH β e ag-FSH β revelou uma identidade de 49,5% (Carvalho *et al.* submetido para publicação), maior daquela calculada para outras espécies de peixes, que é da ordem de 32-40% (Degani *et al.* 2003; So *et al.* 2005; Yoshiura *et al.* 1977). Além das 12 cisteínas conservadas e do primeiro sítio potencial de glicosilação (NQT), outra posição interessante é o segundo sítio de N-glicosilação perdido (alterado para QQT), analogamente ao ag-FSH β e também à região conservada entre a Cys-7 e Cys-8 (Fan e Hendrickson 2005; Laphorn *et al.* 1994). Esta última região, relativa aos tetrápodos, não parece relacionada a nenhuma função conhecida, concentra, porém vários resíduos de prolina que podem ser essenciais para a estrutura proteica das subunidades β , sendo que a prolina tende a dobrar o alinhamento dos AA e a enovelar a proteína (Morgan e Rubinstein 2013; Baldwin 2008).

A presença das 12 cisteínas conservadas é particularmente importante para determinar os nós relativos às 6 pontes dissulfeto que estabilizam o heterodímero (Xing *et al.* 2004) e permitem a atividade do hormônio (Campbell *et al.* 1991; Dias *et al.* 1994; Grossman *et al.* 1997). O alinhamento das sequências dos peptídeos maduros mostrou claramente que esta estrutura é muito mais conservada no LH β que no FSH β (Levi-Sivan *et al.* 2010). A porcentagem de identidade entre aminoácidos mostra de fato uma maior variabilidade para o FSH (27,8-66,6%) quando comparada com o LH (46,6-89,5), o que contrasta com a situação nos

tetrapodas, onde LH β divergiu mais rapidamente que o FSH β . Isto, de acordo com So *et al.* (2005), pode significar uma divergência funcional do FSH em peixes e levanta interessantes perguntas a respeito do diferente significado fisiológico do LH e FSH em grupos diversos de teleósteos. É interessante também observar, no caso de ag-LH β , que a maior identidade entre os aminoácidos do peptídeo maduro é com os Cypriniformes (75,6%) e a menor com os Gadiformes (53,8%), repetindo, diferentemente do FSH β , exatamente a situação apresentada pela subunidade α . Além disto, podemos também observar uma discreta porcentagem de identidade entre as sequências de ag-FSH β , ag-LH β e ag-GTH α e as correspondentes sequências humanas: 45,1%, 51,4% e 66,7%, respectivamente. Isto sugere uma possível atividade biológica *in vivo* por parte das gonadotrofinas de *A. Gigas*, quando testadas em ratos, em comparação com os mesmos hormônios humanos, nos clássicos bioensaios de Steelman e Pohley (1953) e de Storrington e Gaines Das (2001).

A glicosilação é a modificação pós-traducional mais frequente nas proteínas e é fundamental para a definição e a manutenção da atividade biológica das mesmas. Com base no tipo de ligação existente entre aminoácido e carboidrato, a glicosilação pode ser classificada como N-linked (ligação à asparagina) ou O-linked (ligação à serina ou treonina) (Chauan *et al.* 2013). Até agora para as subunidades dos hormônios gonadotróficos foi descrita sempre somente a glicosilação N-linked, seus sítios sendo altamente conservado ao longo da evolução, o que indica a importância desta modificação para as funções destas proteínas. Em comparação com a N-linked, onde a sequência “consenso” N-X-S/T (X sendo qualquer aminoácido exceto a prolina) é bem definida, a glicosilação O-linked não possui sequências “consenso” definida, o que faz a sua predição particularmente difícil. Existem porém condições que favorecem a glicosilação O-linked, como a presença de prolinas e a conformação “ β -sheet” em proximidade do sítio. Com base nestas considerações, vários sítios O-linked foram preditos teoricamente no presente trabalho para ag-LH β e ag-FSH β e um primeiro critério de seleção foi baseado no alinhamento de 82 sequências de LH β e FSH β de peixes. A suposição foi que sítios O-linked da mesma importância dos sítios N-linked, deveriam obviamente ser conservados entre as espécies. Assim, neste alinhamento, foram identificados 5 sítios prováveis de glicosilação O-linked, para

o ag-LH β e ag-FSH β nas posições de AA 29, 37, 64, 79, 85. É interessante observar que o AA29 está localizado no segundo possível sítio de N-glicosilação, que foi perdido e possivelmente substituído por este sítio O-linked.

Para a análise filogenética de ag-LH β foram construídos dois tipos de árvore. A primeira árvore, baseada somente na sequência de aminoácidos de peptídeos maduros de 41 espécies de peixes (Fig. 11), não mostrou uma boa definição filogenética, apesar de confirmar a posição dos Osteoglossiformes dentro do clado dos Osteoglossocefalai, que também inclui os Clupeocephala, não contradizendo assim as conclusões alcançadas na análise das subunidades de GTH α . Uma definição filogenética porém muito maior é evidente na Fig. 12, onde é apresentada uma árvore derivada das sequências concatenadas dos cDNAs de LH β e FSH β relativas a 41 espécies de peixes, por um total, portanto, de 82 diferentes sequências analisadas. Esta árvore colocou o *A.gigas* (Osteoglossomorpha) como grupo irmão dos Clupeocephala (Ostariophysii e Euteleosteomorpha), enquanto os Anguilliformes (Elopomorpha), novamente apareceram como o primeiro ramo divergente entre os teleósteos, confirmando os resultados obtidos na nossa análise do GTH α (Faria *et al.* 2013).

Já mencionamos que a visão convencional de Patterson e Rosen (1977) e de Lauder e Liem (1983), colocando os Osteoglossomorpha como o primeiro ramo divergente entre os teleósteos, foi subsequentemente contestada por Arratia (1999, 2000), que colocou os Elopomorpha nesta posição. A colocação basal dos Elopomorpha tem sido observada em vários estudos recentes, seja morfológicos que moleculares, mesmo se análises recentes, baseadas em DNA mitocondrial, novamente apoiaram a hipótese da divergência basal dos Osteoglossomorpha (Inoue *et al.* 2013; Azuma 2008). Esta contradição foi tentativamente explicada por Broughton *et al.* (2013), sugerindo que isto pode acontecer quando tempos evolutivos relativamente breves e que separam eventos divergentes, produzem sinais filogenéticos bastante reduzidos. Isto significa que árvores individuais podem diferir da árvore verdadeira, que nunca poderá ser conhecida com absoluta certeza. Podemos somente dizer que estudos mais compreensivos, como aquele mostrado na Fig. 12, poderá refletir com maior probabilidade a árvore real.

6 CONCLUSÕES

→ Os cDNAs das subunidades α e β do ag-LH foram isolados e caracterizados pela primeira vez, possibilitando a construção do vetor de expressão dicistrônico para subunidade α . Visando a síntese de ag-LH em células CHO, ainda tem que ser construído o vetor de expressão para ag-LH β .

→ Estes resultados, já permitindo a preparação de anticorpos específicos, ampliam as possibilidades de investigação nas áreas da endocrinologia e da reprodução do *A. gigas* e outros teleósteos.

→ Em comparação com outros dados da literatura, foi analisado o maior número de sequencias de teleósteos, seja para avaliação relativa à identidade de aminoácidos, que para estudos mais específicos de filogenética.

→ As árvores filogenéticas obtidas possibilitaram uma maior compreensão da evolução do *A. gigas*, posicionando os Osteoglossomorpha como grupo irmão dos Clupeocephala, enquanto que os Elopomorpha (Anguilliformes) apareceram como grupo mais basal de todos os teleósteos analisados. Tal resultado concorda com outros dados da literatura, entre eles, o trabalho publicado pelo nosso grupo referente ao estudo da subunidade α do GTH de *A. gigas*.

7 REFERÊNCIAS

- 1- ARRATIA, G. The caudal skeleton of Jurassic teleosts: a phylogenetic analysis. **Sci. Press.**, p. 249–340, 1991
- 2- ARRATIA, G. The sister group of teleostei: consensus and disagreements. **J. Vertebr. Paleontol.**, v. 21, p. 767-73, 2001.
- 3- CAO, H.; ZHOU, L.; ZHANG, Y.Z.; WHEI Q.W.; CHEN, X.H.; GUI, J.F. Molecular characterization of Chinese of Chinese sturgeon gonadotropins and cellular distribution in pituitaries of mature and immature individuals. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.303, p.34-42, 2009.
- 4- CARVALHO, R.F. **Clonagem, caracterização e análise filogenética das subunidades alfa e beta do hormônio folículo estimulante de pirarucu (*Arapaima gigas*) visando sua síntese em células CHO.** 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 5- CARVALHO, R.F.; SEVILHANO, T.C.A.; OLIVEIRA, J.E.; GARCEZ, BARTOLINI, P. Molecular cloning, characterization and phylogenetic analysis of pirarucu (*Arapaima gigas*) FSH and LH β -subunits. Submetido para publicação
- 6- CERDÀ, J.; CHAUVIGNE, F.; AGULLERO, M.J.; MARIN, E.; HALM, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, G.; PRAT, F. Molecular cloning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits and expression pattern during spermatogenesis. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.156, p.470-481, 2008
- 7- CHOI E.; KO H.; SHIN J.; KIM M.A.; SOHN Y.C. Expression of gonadotropin genes in Manchurian trout *Brachymystax lenok* and production of recombinant gonadotropins. **Fisheries. Sci.**, v. 71, p.1193-1200, 2005
- 8- DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J.E.; VORAUER-UHL, K.; PERONI, C.N.; VIANNA, E.G.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing α 2,6-sialyltransferase. **Prot. Expr. Purifi.**, v. 67, p. 7-14, 2009.
- 9- DEGANI, G.; GOLDBERG, D.; TZCHORI, I.; HURVITZ, A.; YOM, D.I.N.S.; JACKSON, K. Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSH-beta subunit, and expression of FSH-beta and LH-beta in males and females after sex determination. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v.136, p. 283-93, 2003
- 10- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucl. Acids. Res.**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, 2004.
- 11- Farias, I. P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H.; Sampaio, I. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. **Mol Ecol Notes.**, v.3, p. 128-130.
- 12- FARIA, M.T.; CARVALHO, R.F.; SEVILHANO, T.C.A.; OLIVEIRA, N.A.J.; SILVA, C.P.F.; OLIVEIRA, J.E.; SOARES, C.R.J.; GARCEZ, R.; SANTO, P.R.E.; BARTOLINI, P. Isolation of the gonadotrophic α -subunit hormone of

- the giant amazonian fish: pirarucu (*Arapaima gigas*). **Fish. Physiol. Biochem.**, v. 39, p. 686-93, 2013.
- 13- FILHO, E.Z.; WEINGARTNER, M. Técnicas da indução da reprodução em peixes migradores. **Rev. Bras. Reprod.** v.31, p.367-73, 2007
 - 14- FONTAINE, M. Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. **Adv. Mar. Biol.**, v.13, p. 241-235, 1975.
 - 15- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p.95-8, 1999
 - 16- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J. Mol. Evol.**, v. 22, p. 160-74, 1985.
 - 17- HILTON, E.J. Comparative osteology and phylogenetic systematics of fossil and living bony-tongue fishes (Actinopterygii, Teleostei, Osteoglossomorpha). **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 137, p. 1-100, 2003.
 - 18- HUANG H.; ZHANG Y.; HUANG W.; LI S.; ZHU P.; LIU Y.; YIN S.; LIU X.; LIN H. Molecular characterization of marbled eel (*Anguilla marmorata*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during artificially induced gonadal development. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.162, p.192-202, 2009
 - 19- HURVITZ A.; DEGANI G.; GOLDBERG D.; DIN S.Y.; JACKSON K.; LEVAVI-SIVAN B. Cloning of FSH β , LH β , and glycoprotein α -subunits from the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), β -subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.140, p.61-73, 2005
 - 20- IMBIRIBA, E.P. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazonica.**, v.31 p.299-316, 2001
 - 21- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Comp. Appl. Biosci.**, v.8, p.275-282, 1982
 - 22- KAMEI, H.; OHIRA, T.; YOSHIURA, Y.; UCHIDA, N.; NAGASAWA, H.; AIDA, K. Expression of a biologically active recombinant follicle-stimulating hormone of Japanese eel, *Anguilla japonica*, using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.134, p.244-254, 2003
 - 23- KASUTO, H.; LEVAVI-SIVAN, B. Production of biologically active tethered tilapia LH beta alpha by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.140, p. 222-32, 2005
 - 24- KAUFMAN, J.R.; DAVIES, V.M.; WASLEY, C.L.; MICHNICK, D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. **Nucl. Acids. Res.**, v.19, p. 4485-90, 1991
 - 25- KAZETO, Y.; KOHARA, M.; MIURA, T.; YAMAGUCHI, S.; TRANT, J.M.; ADACHI, S.; YAMAGUCHI, K. Japanese eel follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH): production of biologically active recombinant FSH and LH by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. **Biol. Reprod.**, v.79, p.938-946, 2008
 - 26- KIM, D.J.; CHO, Y.C.; SO, Y.C. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegeli*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.141, p.282-290, 2005

- 27- KIMURA, M.; OHTA, T. Population genetics of multigene family with special reference to decrease of genetic correlation with distance between gene members on a chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.76, p. 4001-5, 1979
- 28- KOBAYASHI M.; KATO Y.; YISHIURA Y.; AIDA K. Molecular cloning of cDNA encoding two types of pituitary gonadotropins alpha subunit from the goldfish *Carassius auratus*. **Gen. Comp.Endocrinol.**, v.105, p.372-378, 1997
- 29- KOBAYASHI M.; MORITA, T.; IKEGUCHI, K.; YOSHIZAKI, G.; SUZUKI, T.; WATABE, S. Production of recombinant gold fish gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. **Fish. Physiol. Biochem.**, v.28, p.469-471, 2003
- 30- MENDONÇA, F.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotropin and its immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. **J. Chromatogr. A.**, v. 1062, p.103-12, 2005.
- 31- MITTELHOLZER, C.; ANDERSSON E.; TARANGER, G.L.; KARLSEN, O.; NORBERG, B. Quantification of gonadotropin subunits G α , FSH β e LH β mRNA expression from atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout a reproductive cycle. **Comp. Biochem. Physiol B.**, v. 153, p.288-295, 2009
- 32- NARAYAN, P.; WU, C.; PUETT D. Genetic engineering of single-chain gonadotropins and hormone-receptor fusion proteins. **Methods.**, v. 21, p. 59-66, 2000.
- 33- OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography methods for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. **J. Chromatogr. A.**, v. 1164, p. 206-11, 2007.
- 34- ONO, E.A.; HALVERSON, M.R.; KUBITZA, F. Pirarucu, o gigante esquecido. **Panor. Aquic.**, v.14 p.14-25, 2004
- 35- PATTERSON, C.; ROSEN, D.E. Review of the ichthyododectiform and other mesozoic fishes and the theory and practice of identifying fossils. **B. Am. Museum. Nat. Hist.**, v. 158, p. 81-172, 1977.
- 36- PERONI, C.N.; SOARES, C.R.J.; GIMBO, E.; MORGANTI, L.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 35, p. 19-26, 2002.
- 37- PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G.V.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat. Methods.**, v. 8, p. 785-86, 2011.
- 38- RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. **J. Chromatogr. B.**, v. 790, p. 285-316, 2003.
- 39- SAINT, P.U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: A Review. **Aqua.**, v. 54, p. 205-40, 1986.
- 40- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.**, v.4, p.406-25, 1987.
- 41- SCHMITZ, M.; AROUA, S.; VIDAL, B.; LE BELLE, N.; ELIE, P.; DUFOUR, S. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. **Neuroendocrinol.**, v.81, p.107-19, 2005

- 42- SHEETS, M.D.; OGG, S.C.; WICKENS, M.P. Point mutations in AAUAAA and in the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, p. 5799-05, 1990.
- 43- SHEIN, N.L.M.; TAKUSHIMA, M.; NAGAE, H.; CHUDA, K. Molecular cloning of gonadotropin cDNA in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. **Fish. Physiol. Biochem.**, v. 28, p. 107–8, 2003.
- 44- SO W-K.; KWOK H-F., GE W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits- their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. **Bio. Reprod**, v.72, p.1382-1396, 2005
- 45- SOWER, SA.; FREAMAT, M.; KAVANAUGH, SI. The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys. **Gen Comp Endocrinol**, v.161, p.20-29, 2009.
- 46- SWANSON, P.; DICKEY, JT.; CAMPBELL B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. **Fish Physiol Biochem.**, v.28, p.53-59, 2003
- 47- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, p. 2731-9, 2011.
- 48- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, p. 2725-9, 2013.
- 49- UCHIDA, K.; MORIYAMA, S.; SOWER, S.A.; NOZAKI, M. Glycoprotein hormone in the pituitary of hagfish and its evolutionary implications. **Fish. Physiol. Biochem.**, v. 39, p. 75-83, 2013.
- 50- WELTZIEN, F.A.; KOBAYASHI, T.; ANDERSSON E.; NORBERG B.; ANDERSEN O. Molecular characterization and expression of FSH β , LH β and common α -subunit in male Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*) **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.131, p.87-96, 2003
- 51- WWF-BRASIL. *Conservação e Manejo do Pirarucu-Sustentabilidade nos Lagos do Acre*. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.wwf.org.br/29623/Manejo-do-Pirarucu-Sustentabilidade-nos-Lagos-do-Acre>>. Acesso em 4 de agosto de 2014.
- 52- ZMORA, N.; KAZETO, Y.; KUMAR, R.S.; SCHULZ, R.W.; TRANT, J.M. Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 Drosophila cell line and na indication of their different actions. **J. Endocrinol.**, v.194, p.407-416, 2007
- 53- YOSHIURA, Y.; KOBAYASHI, M.; KATO, Y.; AINDA, K. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin β -subunits (GTH-I β E –II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.105, p.379-389, 1997
- 54- YU, X.; LIN, S.; KOBAYASHI, M.; GE, W. Expression of recombinant zebrafish follicle-stimulating hormone (FSH) in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **Fish Physiol Biochem.**, v. 36, p.273-281
- 55- ZOHAR, Y.; MUÑOZ-CUETO, JA.; ELIZUR, A.; KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **Gen Comp Endocrinol.**, v.165, p438-455, 2010